1801 — 34992

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1910

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

M. Paul DESCOMPS

Ancien interne des hôpitaux de Paris

TRAVAIL DU SERVICE ET DES LABORATOIRES DE M. LE PROFESSEUR GILBERT

SUR UN

NOUVEAU PROCÉDÉ DE DOSAGE DE L'UROBILINE ET DE LA STERCOBILINE

Président : M. GILBERT, *Professeur.*

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE 2

1910

UNIVERSITÉ DE PARIS. — FACULTÉ DE MÉDECINE

Doyen	M. LANDOUZY.
Professeurs	MM.
Anatomie	NICOLAS.
Physiologie	Ch. RICHET.
Physique médicale	GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale	GAUTIER.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	BLANCHARD.
Pathologie et thérapeutique générales	ACHARD.
Pathologie médicale	DEJERINE. WIDAL.
Pathologie chirurgicale	LANNELONGUE.
Anatomie pathologique	MARIE (Pierre).
Histologie	PRENANT.
Opérations et appareils	HARTMANN.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET.
Thérapeutique	GILBERT.
Hygiène	CHANTEMESSE.
Médecine légale	THOINOT.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	CHAUFFARD.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER.
Clinique médicale	HAYEM. DIEULAFOY. DEBOVE. LANDOUZY.
Clinique des Maladies des enfants	HUTINEL
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale	BALLET (Gilbert).
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GAUCHER.
Clinique des maladies du système nerveux	RAYMOND.
Clinique chirurgicale	QUENU. RECLUS. SEGOND. DELBET.
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE.
Clinique des maladies des voies urinaires	ALBARRAN.
Clinique d'accouchements	PINARD. BAR. RIBEMONT-DESSAIGNES.
Clinique gynécologique	POZZI.
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON.
Clinique thérapeutique	ROBIN.

Agrégés en exercice :

MM.

AUVRAY.	CUNEO.	LAUNOIS.	NOBÉCOURT.
BALTHAZARD.	DEMELIN.	LECÈNE.	OMBREDANNE
BEZANÇON.	DESGREZ.	LEGRY.	POTOCKI.
BRANCA.	DUVAL.	LENORMANT.	PROUST.
BRINDEAU.	GOSSET.	LOEPER.	RENON.
BROCA (André).	GOUGET.	MACAIGNE.	RICHAUD.
BRUMPT.	JEANNIN.	MAILLARD.	RIEFFEL.
CARNOT.	JEANSELME.	MARION.	SICARD
CASTAIGNE.	JOUSSET.	MORESTIN.	ZIMMERN.
CLAUDE.	LABBÉ.	MULON.	
COUVELAIRE.	LANGLOIS.	NICLOUX.	

Chef des Travaux anatomiques : M. DESTOUCHES.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

412

A MES PARENTS ET A MES AMIS

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. Le Professeur GILBERT

A MON CHER MAITRE

M. Le Professeur RAYMOND

A MES MAITRES D'INTERNAT

MM. le Professeur DE LAPERSONNE, (Hôtel-Dieu, 1905-1906).
le Professeur agrégé TERRIEN, —
le Professeur RAYMOND, (Salpétrière, 1906-1907).
le professeur agrégé CLAUDE, —
le professeur agrégé Pierre TEISSIER, (Claude-Bernard, 1906-1907).
le professeur agrégé SICARD, (Hôtel-Dieu, 1907-1908).
le professeur GILBERT, Broussais, 1908-1909).
le professeur agrégé CARNOT —

A MES MAITRES D'EXTERNAT

MM. les Docteurs ENRIQUEZ, LEJARS, THIROLOIX, WALTHER.

A TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUÉ A MON INSTRUCTION

M. le professeur Pierre DELBET.
MM. les Docteurs AUVRAY, BRINDEAU, CAUSSADE, DESGREZ, DUPRÉ, GARNIER, GRIFFON, HERSCHER, LŒPER, LEREBOULLET, MARION, OMBRÉDANNE, André PETIT, Auguste PETTIT, SÉBILEAU.

A LA MÉMOIRE DE MON MAITRE

Le Professeur BRISSAUD.

AVANT-PROPOS

L'idée première de ce travail était l'étude des flux bilieux ou, d'une façon plus générale, celle des syndromes polycholiques.

Mais, avant d'entreprendre une telle étude, il était de toute nécessité de pouvoir doser dans les excréta, d'une part, la bilirubine et, d'autre part, l'urobiline et la stercobiline.

La méthode de dosage de la bilirubine de MM. Gilbert et Herscher nous permettait de résoudre la première difficulté.

Mais lorsque nous avons voulu solutionner la seconde, à savoir le dosage de l'urobiline et de la stercobiline, nous nous sommes rapidement convaincu de l'insuffisance des méthodes existantes.

De là, pour nous, la nécessité de chercher à édifier un procédé nouveau, à la fois clinique et cependant suffisamment exact.

C'est l'exposé de ces recherches, c'est la description de ce procédé que nous nous proposons de développer dans ce travail, qui n'est, en définitive, que la préface indispensable, que l'introduction obligatoire à l'étude des variations de la sécrétion et de l'excrétion biliaire.

C'est sur les indications de M. le P^r^ Gilbert que nous nous sommes proposé d'entreprendre cette étude ; c'est grâce à l'intérêt qu'il a bien voulu porter à la poursuite de nos expériences, aux conseils qu'il a bien voulu nous prodiguer, que nous avons pu mener à bien notre tâche. Que notre excellent Maître nous permette donc de lui dédier ce travail et de le remercier des preuves d'affection qu'il n'a cessé de nous témoigner depuis que nous avons eu le bonheur d'être son interne.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

CHAPITRE PREMIER

Considérations générales sur l'hydrobilirubine, l'urobiline, la stercobiline et leurs chromogènes.

Hydrobilirubine, urobiline, stercobiline, sont les noms synonymes d'une seule et même substance : le pigment de Jaffé, dont la caractéristique spécifique est de donner en solution, soit chloroformique, soit amylique, et en présence d'un sel de zinc, une belle fluorescence verte.

En pratique, on réserve le nom d'urobiline au pigment extrait des urines, et celui de stercobiline, au pigment extrait des fèces.

Quant à l'hydrobilirubine, mot qui a l'avantage de rappeler la constitution chimique même du pigment de Jaffé, c'est le terme générique, l'appellation de groupe, désignant la famille générale des « bilines » et s'appliquant, par conséquent, tant à l'urobiline qu'à la stercobiline.

Dans les pages qui suivent, nous allons étudier, d'une part, l'hydrobilirubine extraite des urines, c'est-à-dire, l'urobiline et son chromogène et, d'autre part, l'hydrobilirubine extraite des matières fécales, c'est-à-dire, la stercobiline et son chromogène.

I. — L'urobiline.

L'urobiline peut se définir par sa propriété essentielle, spécifique, de donner en solution soit chloroformique, soit amylique, une fluorescence verte par addition d'un sel de zinc.

C'est Jaffé qui découvrit ce pigment dans l'urine en 1868 et lui donna le nom d'urobiline, voulant reconnaître par là ses relations avec les pigments biliaires.

Elle répond à la formule brute $C^{32}H^{40}Az^4O^7$. Au point de vue chimique, c'est une amine à fonction acide.

L'urobiline, aujourd'hui nettement différenciée, fut confondue d'abord avec d'autres corps et, en particulier, avec l'urochrome de Thudichum. Mac Munn et Jolles ont voulu distinguer deux sortes d'urobiline : l'urobiline physiologique et l'urobiline pathologique, en s'appuyant surtout sur les différences de l'analyse spectrale. Tous les auteurs sont d'accord aujourd'hui pour affirmer que l'urobiline pathologique de Mac Munn est un produit impur, dans lequel d'autres pigments viennent se mélanger à l'urobiline, et l'accord est unanime pour défendre l'unité de l'urobiline ou pigment de Jaffé.

Cette urobiline présente des rapports très étroits avec les pigments biliaires. Elle dérive, en effet, de la bilirubine par hydrogénation. La réaction est représentée par la formule suivante :

$$\underset{\text{Bilirubine}}{C^{32}H^{36}Az^4O^6} + H^2O + H^2 = \underset{\text{Urobiline}}{C^{32}H^{40}Az^4O^7}$$

R. Maly a pu expérimentalement réaliser cette réaction en traitant de la bilirubine par l'amalgame de sodium. Au composé qu'il avait obtenu ainsi par réduction, Maly donna le nom d'hydrobilirubine, que tout le monde s'ac-

corde aujourd'hui à considérer comme identique à l'urobiline.

1° ***Principaux procédés d'extraction de l'urobiline.***

A) *Méthode de Jaffé.* — On verse dans l'urine un excès d'ammoniaque ; on filtre ; dans le liquide filtré on ajoute du chlorure de zinc, tant qu'il se produit un trouble. Il se forme ainsi des flocons volumineux qui sont lavés successivement à l'eau froide, puis à l'eau chaude, jusqu'à ce qu'ils ne contiennent plus de chlorure ; on épuise alors par l'alcool et on filtre. On traite la masse pulvérisée par l'ammoniaque et la solution est additionnée d'acétate de plomb ; il se produit ainsi un précipité rouge qu'on lave à l'eau froide et qu'on dessèche. On traite ce précipité par l'alcool additionné d'acide sulfurique et on obtient, par évaporation de la liqueur filtrée, de l'urobiline à l'état de pureté.

B) *Méthode de Maly.* — Il précipite l'urine par l'acétate de plomb, lave le précipité, le chauffe plusieurs fois avec de l'alcool et le décompose par de l'alcool contenant une certaine quantité d'acide sulfurique. La solution ainsi obtenue est saturée par de l'ammoniaque, puis additionnée de chlorure de zinc, qui forme un précipité. Ce précipité est successivement traité par l'ammoniaque, l'acétate de plomb et l'alcool. L'extrait alcoolique est additionné de chloroforme ; celui-ci s'empare de l'urobiline, qui est obtenue par évaporation.

C) *Méthode de Mac Munn.* — Il précipite successivement l'urine par l'acétate et le sous-acétate de plomb. Les deux précipités, qui ont entraîné l'urobiline, sont réunis, puis décomposés par l'alcool sulfurique, qui dissout seulement l'urobiline ; on filtre, puis on agite le liquide filtré

avec du chloroforme, après addition d'une grande quantité d'eau. Le chloroforme s'empare de l'urobiline pure, qu'il abandonne ensuite par évaporation.

D) *Procédé de Méhu.* — Le procédé de Méhu consiste à aciduler l'urine avec un à deux grammes d'acide sulfurique par litre, puis à saturer cette urine par le sulfate d'ammoniaque. Il se forme ainsi des flocons bruns ; on filtre et on lave le précipité sur le filtre avec de l'eau acidulée et saturée de sulfate d'ammoniaque. Le résidu est pressé, puis repris à chaud par l'alcool absolu additionné de quelques gouttes d'ammoniaque ; l'évaporation de l'alcool abandonne l'urobiline.

E) *Procédé Hoppe-Seyler.* — On acidifie l'urine avec de l'acide sufurique ou acétique et on la sature ensuite de sulfate d'ammoniaque. L'urobiline se précipite au bout de quelques heures en flocons roses qu'on recueille sur un filtre. On lave avec une solution saturée de parties égales de chloroforme et d'alcool. Le mélange est traité plusieurs fois de suite par de l'eau dans un entonnoir à robinet. Enfin dans un becherglass ; on évapore le chloroforme au bain-marie. Le résidu desséché est extrait avec de l'éther. On filtre la solution éthérée d'urobiline, on laisse évaporer, on traite à nouveau par l'alcool et on obtient définitivement une urobiline sensiblement pure.

2° *Propriétés générales.*

L'urobiline obtenue par ces divers procédés est un corps plus ou moins impur, amorphe, résinoïde, de coloration brun-rouge. Jamais jusqu'à ce jour on n'a pu obtenir de l'urobiline cristallisée.

Solubilité. — L'urobiline est soluble dans l'alcool éthylique, moins dans l'éther sulfurique. A notre avis son meilleur dissolvant est l'alcool amylique. Elle est égale-

ment très soluble dans l'éther acétique et dans le chloroforme et surtout dans le chloroforme thymolé. Elle est peu soluble dans l'eau, mais s'y dissout facilement après addition d'alcalis ou même d'acides.

Insolubilité. — L'urobiline est complètement insoluble dans l'eau additionnée de sulfate d'ammoniaque, d'acétate de plomb, etc., surtout en milieu acide.

Pouvoir tinctorial. — La couleur des solutions varie avec la nature du dissolvant. Les solutions chloroformiques sont rouges ou roses; les solutions aqueuses sont jaunes; les solutions dans l'alcool amylique sont jaune ambré.

Diffusibilité. — L'urobiline est très diffusible. Elle l'est beaucoup plus que les pigments biliaires, mais moins que son chromogène (Hayem.). Achard et Monfaux indiquent l'ordre de diffusibilité suivant : 1° chromogène; 2° indican; 3° urobiline; 4° pigments biliaires. Meillère arrive aux mêmes conclusions.

Le sulfate de cuivre et la lessive de soude donnent avec l'urobiline une coloration que l'on pourrait confondre avec la réaction du biuret.

Réactions spectrales. — Les réactions spectrales de l'urobiline sont ainsi définies par le Pr Hayem.

« L'urobiline, en solution acide, présente une bande à l'union du bleu et du vert. Dans un spectre dont la raie D correspond au n° 100 de l'échelle micrométrique, la bande d'urobiline se trouve à peu près à cheval sur 140 — limite gauche du bleu. — Elle s'étend, à gauche et à droite de cette ligne, de 135 à 148, formant une bande d'absorption large et nette dont le maximum est situé entre 138 et 146, soit entre 500 et 485 longueurs d'onde.

Lorsque la solution a été traitée par l'ammoniaque et le chlorure de zinc, la bande se trouve reportée vers la

gauche. Elle s'étend des divisions 128 à 137.... etc., en s'entourant d'une ombre qui peut atteindre d'un côté 135 et de l'autre 140; le maximum d'absorption correspond à 130, 135, soit à 518, 505, longueur d'onde ». (Hayem).

Réaction fluorescente en présence des sels de zinc. — Caractéristique de l'urobiline, elle a servi à la définir; nous y reviendrons ultérieurement.

2° *Chromogène de l'urobiline.*

Le chromogène de l'urobiline est un corps moins oxydé que l'urobiline. Signalé dès ses premiers travaux par Jaffé, il fut bien étudié par Disqué, qui le dénomme encore leuco-urobiline.

Extraction. — On le retire de l'urine par le procédé de Winter. L'urine est filtrée, puis saturée à froid par le sulfate d'ammoniaque. On filtre, on dessèche le filtrat et on le lave sur le filtre avec de l'éther pur qui dissout l'urobiline et son chromogène. La liqueur éthérée est agitée avec de l'eau distillée alcalinisée, qui dissout le chromogène; celui-ci reste en solution éthérée. On l'obtient alors par évaporation dans le vide.

Propriétés générales. — Il se présente sous forme d'un produit résinoïde, jaune ambré.

Ses solutions ne donnent pas au spectroscope la bande d'absorption caractéristique de l'urobiline.

Par oxydation — eau iodo-iodurée, teinture d'iode, acide chlorhydrique, etc., — il se transforme facilement en urobiline. L'action de l'air et de la lumière suffit du reste, à oxyder le chromogène et c'est la raison pour laquelle on voit se colorer peu à peu, à l'air, des urines pâles à l'émission. (Saillet).

3° *Principaux procédés de recherche de l'urobiline et de son chromogène.*

A). — *Recherche de l'urobiline.*

Procédé de M. Grimbert. — On défèque l'urine avec le réactif de Denigès au sulfate acide de mercure. Pour cela on prend 30 centimètres cubes d'urine et 20 centimètres cubes du réactif de Denigès, on agite et on filtre. On ajoute au filtrat 4 centimètres cubes de chloroforme et après agitation et repos, on décante le chloroforme, que l'on filtre sur un petit tampon d'ouate hydrophile. Le chloroforme ainsi séparé et parfaitement clair est additionné de réactif de Roman-Delluc (acétate de zinc 1 gramme; alcool à 95° 1000 grammes; acide acétique, X gouttes). Il se forme tout d'abord un précipité qui se dissout bientôt dans un excès de réactif; on obtient alors une belle fluorescence verte, si l'urine examinée contient de l'urobiline.

Ce procédé a un inconvénient, c'est que la défécation préalable au sulfate acide de mercure précipite, non seulement les substances gênantes pour la recherche, autres que l'urobiline, mais aussi l'urobiline elle-même, du moins en partie. Dès lors, il faudra que l'urine contienne une notable proportion d'urobiline pour qu'on puisse espérer obtenir la fluorescence caractéristique par ce procédé.

B). *Procédé de M. Auché.* — On prend 15 à 20 centimètres d'urines; on y ajoute 2 à 3 centimètres cubes d'une solution de chloroforme thymolé à 15 p. 0/0 après s'être assuré de la réaction des urines; celles-ci doivent être très légèrement, mais très franchement acides. On agite et on décante après repos l'urine surnageante. On traite la

solution qui reste au fond du tube par quelques gouttes d'alcool fort, puis on ajoute une quantité suffisante de réactif de Roman-Delluc et la fluorescence apparaît.

C). *Procédé de MM. Gilbert et Herscher.* — On opère sur 60 centimètres cubes d'urine filtrée et 20 centimètres cubes d'alcool amylique que l'on place dans un verre dit à expériences. Au moyen d'un agitateur, on mélange les deux liquides, en ayant soin de ne pas émulsionner l'alcool amylique; il suffit pour cela d'agiter en frottant l'agitateur sur les parois du verre. On laisse ensuite le mélange au repos pendant 5 minutes; l'alcool amylique, teinté en jaune rougeâtre si l'urine renferme de l'urobiline, vient à la surface et se sépare nettement de l'urine. On le décante à l'aide d'une pipette de verre dans un tube à essai et on y ajoute 3 ou 4 gouttes de chlorure de zinc ammoniacal à 5 p. 0/0. Si l'urine contient de l'urobiline, on obtient une magnifique fluorescence verte.

On peut compléter tous ses procédés par la recherche de l'urobiline au spectroscope.

B). *Recherche du chromogène de l'urobiline.*

Procédé de M. Grimbert. — On oxyde préalablement ce chromogène avec deux gouttes de liqueur de Gram et on opère ensuite comme pour la recherche de l'urobiline.

B). *Procédé de MM. Gilbert et Herscher.* — On met dans un tube à essai environ 2/3 d'urine filtrée pour 1/3 de chloroforme; on agite le mélange par renversement en bouchant la partie supérieure du tube avec le pouce; l'agitation doit être faite modérément pour éviter l'émulsion du chloroforme; on laisse en repos pendant cinq minutes. Ensuite au moyen d'une pipette, on aspire la partie inférieure du liquide, c'est-à-dire la partie chloroformique; on la filtre sur un tampon de ouate hydrophile. On

a donc une liqueur chloroformique limpide, renfermant le chromogène de l'urobiline contenu dans l'urine : à cette liqueur on ajoute une ou deux gouttes d'acide nitrique ; s'il y a du chromogène, le chloroforme se colore en rose : la coloration passe ensuite au brun, s'il y en a en abondance.

C). *Recherche simultanée de l'urobiline et de son chromogène.*

Procédé de MM. Gilbert et Herscher. — On peut rechercher l'urobiline et le chromogène dans la même opération ; pour cela on transforme le chromogène en urobiline en l'oxydant par quelques gouttes de liqueur de Gram et l'on opère ensuite comme il a été dit précédemment, avec 60 centimètres cubes d'urine et 20 centimètres cubes d'alcool amylique. On décante l'alcool amylique avec précaution et on ajoute le réactif ammoniaco-zincique : on obtient ainsi la fluorescence caractérisque.

2. — Stercobiline.

En 1871, van Lair et Masius appelèrent stercobiline un pigment qu'ils avaient extrait des matières fécales.

Van Lair et Masius remarquèrent que la stercobiline avait le même spectre que l'urobiline : une bande d'absorption entre le vert et le bleu. De plus elle présentait d'autres bandes plus petites dans l'orange et elle obscurcissait les deux extrémités du spectre. Le pigment donnait en outre, comme l'urobiline, la réaction de fluorescence avec le chlorure de zinc ammoniacal. On rapprocha donc ce corps de l'urobiline ou hydrobilirubine.

Mais Mac Munn avait déjà trouvé dans l'urine des fébricitants, un pigment présentant en plus du spectre de

l'urobiline, deux bandes dans l'orange ; et il en avait fait la caractéristique de l'urobiline fébrile. C'est à ce corps que la stercobiline fut identifiée.

Cependant Beck attribue à des impuretés, tout ce qui dans le spectre n'appartient pas à la stercobiline, et il montre que dans les fèces, à côté de la stercobiline, on trouve un pigment, donnant naissance aux bandes dans l'orange.

Ces conclusions sont adoptées par Jarrod et Hopkins, Kiener et Engel, Hayem, Schmidt et Strassburger, Supino, Giovanni Marini et enfin Steensma. La question semble donc résolue à l'étranger : l'urobiline existe normalement dans les fèces et prend alors le nom de stercobiline ; elle est due à la réduction de la bilirubine que le foie déverse dans l'intestin.

En France, en 1905, Roux et Riva étudient la stercobiline, suivant la réaction de Schmidt et ils trouvent que, normalement, elle existe toujours dans les fèces.

Chauffard et Rendu, en 1907, arrivent à des conclusions bien différentes. En effet « la présence d'urobiline dans les fèces leur apparaît, comme un signe très délicat et très sensible des troubles fonctionnels ou des lésions plus ou moins prononcées de la cellule hépatique, et, plus l'urobiline fécale sera abondante, plus on sera en droit de supposer une adultération profonde de la glande biliaire. »

Peu après Gilbert et Herscher, dans une série de communications à la Société de Biologie, montrent que la stercobiline fécale est le produit de la transformation par un intestin normal des pigments biliaires normaux, et ils rapprochent ce fait de la transformation en urobiline dans le rein des pigments normaux, contenus dans le sang dans le cas de cholémie.

Récemment Lemaire, dans une revue générale sur la

stercobiline, Triboulet, à propos de l'étude des pigments biliaires chez les nourrissons, Mongès, de Marseille, dans sa thèse sur la Coprologie se rallient à la théorie de Gilbert et Herscher, pour qui l'urobiline fécale ou stercobiline est le pigment normal des fèces, dû à la transformation par un intestin normal de la bilirubine.

1° ***Principaux procédés d'extraction de la stercobiline.***

A) Procédé de van Lair et Masius. — Les auteurs l'obtiennent en traitant les fèces par de l'alcool additionné d'acide sulfurique dans la proportion de 17 grammes d'alcool pour 3 grammes d'acide. Ils agitent ensuite l'extrait ainsi obtenu avec du chloroforme. Ce chloroforme laisse déposer par évaporation la matière colorante que l'on n'a plus qu'à recueillir.

B) Méthode d'Auché. — « On introduit dans un flacon d'un litre, à large ouverture, 200 à 300 grammes de matières normales, fraîches et neutres. On ajoute immédiatement 500 centimètres cubes de chloroforme et on agite violemment pendant quelques minutes. On traite ensuite par un litre de ligroïne, employé en plusieurs fois ; le chloroforme chargé de chromogène passe dans la ligroïne. Tous les liquides séparés sont filtrés et reçus dans une large cuvette en porcelaine, où ils sont abandonnés à l'évaporation spontanée pendant laquelle le *chromogène se transforme en urobiline.* Le résidu est repris par 100 à 200 centimètres cubes de ligroïne ; celle-ci dissout diverses impuretés, grâce auxquelles elle retient une assez grande quantité d'urobiline (absolument insoluble dans la ligroïne pure) ; mais la plus grande partie du pigment est précipitée en grumeaux résineux qu'il faut séparer par filtration et réduire en poudre, afin qu'ils subissent, dans

de bonnes conditions, l'action des traitements ultérieurs. Cette poudre est reversée dans la ligroïne filtrée ; on place le tout dans un flacon d'un litre, on ajoute 500 centimètres cubes d'eau distillée, et on agite fortement. Par le repos, l'eau se sépare, colorée en jaune foncé par une grande quantité d'urobiline, dissoute à la faveur d'impuretés entraînées en même temps. La ligroïne retient les graisses, des pigments tels que la chlorophylle, et autres impuretés ; on siphonne l'eau qu'on reçoit sur un filtre mouillé, dans un flacon de 2 à 3 litres ; on la remplace par de l'eau pure, et on recommence tant que celle-ci se colore et présente, sous une faible épaisseur, une forte bande d'urobiline La totalité des liquides aqueux est additionnée d'un gramme d'acétate de zinc dissous dans 10 à 20 centimètres cubes d'eau et agitée. On ajoute juste assez d'ammoniaque pour précipiter tout le zinc à l'état d'hydrate (XX gouttes). Il se forme immédiatement un précipité floconneux semblable à du sulfure d'antimoine ; toute l'urobiline est fixée ; on jette sur un filtre sans pli et l'eau passe incolore. On lave le précipité successivement : à l'alcool, à l'éther, à la ligroïne et au chloroforme ; puis on le dissout, sur le filtre même, dans 20 à 25 centimètres cubes d'alcool additionnés d'une faible quantité d'acide chlorhydrique. Le liquide, rouge foncé, limpide, est additionné d'un volume double de chloroforme et d'un volume égal d'eau distillée, dans une boule à robinet. Le chloroforme s'empare de l'urobiline, on le sépare, le lave par agitation modérée, avec son volume d'eau. Le chloroforme séparé est maintenant un peu trouble ; on le filtre sur un gros tampon de coton hydrophile qui retient l'eau ; il passe limpide, est reçu dans une petite cuvette et abandonné à l'évaporation spontanée. Le produit obtenu est souvent

impur, on le reprend par quelques centimètres cubes d'un mélange de chloroforme et d'éther (ce dernier pour atténuer le pouuoir dissolvant du chloroforme) et on ajoute 200 centimètres cubes d'éther de pétrole, qui précipite l'urobiline en poudre impalpable, laquelle met plusieurs jours à se déposer. Aussi vaut-il mieux filtrer sur un tout petit filtre, laver avec un peu de ligroïne neuve, redissoudre dans quelques centimètres cubes de chloroforme pur et abandonner à l'évaporation dans un petit cristallisoir. Le produit final doit être brillant, bien sec, se détacher en lamelles fines, qui ne doivent pas s'agglomérer si le produit est convenablement purifié ». (Auché.)

2° ***Propriétés générales.***

La stercobiline se caractérise par les mêmes propriétés essentielles que l'urobiline, puisque stercobiline et urobiline sont un seul et même corps.

Ses deux réactions spécifiques seront donc :

1° Son spectre : une bande d'absorption à l'union du bleu et du vert ;

2° Sa fluorescence obtenue en traitant une solution de stercobiline avec quelques gouttes d'un sel de zinc.

3° ***Chromogène de la stercobiline ou stercobilinogène.***

Le stercobilinogène est un corps moins oxydé que la stercobiline. Il est à cette dernière ce que l'urobilinogène est à l'urobiline. Il a surtout été étudié en France par Gilbert et Herscher.

Extraction. — On peut l'obtenir par le procédé d'extraction de la stercobiline de van Lair et Masius, en ayant soin simplement de l'oxyder par l'addition de quelques gouttes de teinture d'iode ou de liqueur iodo-iodurée par exemple, afin de le transformer en stercobiline.

L'action de l'air et de la lumière est suffisante du reste, pour opérer cette oxydation. (Gilbert et Herscher).

En règle générale les fèces normales de l'adulte contiennent surtout du stercobilinogène, ainsi que nous avons pu le constater, après MM. Gilbert et Herscher.

4° *Principaux procédés de recherche de la stercobiline et de son chromogène dans les fèces.*

a) *Procédé de Chauffard et Rendu.* — On épuise 2 centimètres cubes de matières fécales avec 30 centimètres cubes d'eau : on ajoute 10 centimètres cubes de réactif de Deniges, au bout de 3 minutes on filtre et on ajoute 3 centimètres cubes de chloroforme ; on décante et on caractérise l'urobiline par la réaction de fluorescence.

b) *Procédé de Gilbert et Herscher.* — 1° *Stercobiline.* — Il consiste à traiter 2 à 3 centimètres cubes de matières fécales par 30 centimètres cubes d'alcool amylique : après agitation pendant 2 ou 3 minutes on décante et on filtre l'alcool qui contient l'urobiline. On peut se servir de chloroforme au lieu d'alcool amylique ; après décantation il présente s'il contient de la stercobiline une teinte jaune, rose ou rouge.

2° *Stercobilinogène.* — Pour la recherche du stercobilinogène, on procède de la même façon, mais il faut de plus oxyder le stercobilinogène pour le transformer en stercobiline : si on ajoute au mélange d'alcool amylique et de chlorure de zinc, quelques gouttes de liqueur de Gram, la fluorescence se produit alors, quand l'alcool ne contient que du stercobilinogène ; elle s'est produite avant l'addition de liqueur de Gram et s'accentue après si elle contient un mélange de stercobilinogène et de stercobiline. Si on se sert de chloroforme, on ajoute à celui-ci quelques gouttes d'acide

nitrique nitreux ; une teinte rose ou rouge se montre ou s'accentue suivant qu'il n'y a pas ou qu'il y a de la stercobiline associée au stercobilinogène.

c) *Procédé de Schmidt.* — « On traite dans un récipient de cristal plat la selle délayée, avec une solution aqueuse concentrée de sublimé. On en fait le mélange et on laisse le tout au repos jusqu'au lendemain. » La selle se colore en rouge, si elle contient de la stercobiline, en vert si elle contient de la bilirubine.

d) *Procédé de Triboulet.* — Triboulet a repris la méthode de Schmidt en la modifiant. On met gros comme une petite noisette de matières fraîchement émises, dans un tube à essai de petit calibre que l'on remplit aux deux tiers d'eau distillée, on bouche et on agite fortement. On verse alors VIII à X gouttes de la solution de sublimé acétique dont nous parlerons plus loin : les matières tombent au fond du tube et l'on voit se produire, soit immédiatement, soit plutôt en un quart d'heure ou une demi-heure, une coloration du dépôt et du liquide, variant du rose lilas au rose rouge, si les matières contiennent de la stercobiline : on constate en même temps que le liquide de dilution est trouble.

CHAPITRE II

Histoire et critique des principaux procédés de dosage de l'urobiline et de la stéréobiline.

Depuis 1868, date à laquelle Jaffé isola pour la première fois l'urobiline, on s'est préoccupé de son dosage. Les travaux entrepris à ce sujet sont nombreux et témoignent de l'intérêt, qui s'est toujours attaché à l'étude de cette question. Nous nous proposons de décrire, dans les lignes qui suivent, les principaux d'entre eux, en donnant au cours de notre description les raisons pour lesquelles, tous ces procédés de dosages nous paraissent plus ou moins imparfaits,

I. — Dosage de l'urobiline.

1° *Dosage en poids de l'urobiline.*

Le type de cette méthode nous est fourni par le procédé d'*Hoppe-Seyler* dont voici la technique résumée : on prend un volume déterminé d'urine, qu'on acidifie avec de l'acide sulfurique ou acétique : on sature ensuite avec du sulfate d'ammoniaque. Dès que le liquide s'est reposé pendant quelques heures, toute l'urobiline se dépose en flocons roses qu'on recueille sur un filtre. On lave avec une solution saturée de parties égales de chloroforme et d'alcool. Le mélange est traité plusieurs fois de suite par de l'eau dans un entonnoir à robinet. Enfin dans un becher-glass, préalablement pesé, on évapore le chloroforme au bain-marie. Le résidu desséché est extrait avec de l'éther.

On filtre la solution éthérée d'urobiline ; on laisse évaporer, on traite à nouveau par l'alcool qu'on évapore ; le résidu desséché est pesé.

C'est là sans conteste un procédé très rigoureux, bien que le résidu total renferme bien autre chose que la seule urobiline. De plus il faut se trouver en présence d'une urine renfermant des proportions notables d'urobiline.

Mais surtout c'est un procédé long, délicat, et qui exige une grande habitude des manipulations chimiques, et aussi des connaissances spéciales, qui sont plus du domaine du chimiste que de celui du médecin. En pratique du reste, on ne s'en sert jamais et on le réserve en général pour des épreuves de contrôle.

2° *Dosage de l'urobiline par l'examen spectroscopique ou colorimétrique.*

La recherche de l'urobiline dans l'urine peut être faite par l'examen direct au spectroscope et si on examine l'urine dans des tubes plus ou moins profonds ou plus ou moins larges, on peut apprécier *approximativement* la quantité d'urobiline contenue dans l'urine. C'est là le principe général, qui a servi de base à toutes les méthodes de dosage, établies sur l'apparition au spectroscope de la bande caractéristique de l'urobiline.

Mais pour une analyse exacte, il faut un procédé plus rigoureux.

On s'est donc proposé de résoudre le problème suivant : à quelle épaisseur peut-on observer nettement le phénomène de la bande caractéristique ? Et alors on déduira la quantité d'urobiline à l'aide de tables établies d'avance. — C'est croyons-nous, *Vierordt,* qui le premier s'est servi de cette méthode pour doser de l'urobiline.

Pour apprécier l'épaisseur de l'urine à laquelle s'observe nettement le phénomène de la bande unique, caractéristique de l'urobiline, *Hénocque* se sert d'une éprouvette graduée à fond bien plat ou d'un godet gradué placé sur un miroir incliné, puis d'une indigotière ou vase prismatique à faces bien planes, portant une graduation correspondant à une échelle construite empiriquement. Cet appareil donne des épaisseurs graduellement progressives.

On désigne sous le nom de « *spectroscopes pour l'observation de l'urine sous des épaisseurs variables* » des appareils plus compliqués, dans lesquels les mouvements sont exécutés mécaniquement, ce qui rend les mensurations de l'épaisseur plus faciles à déterminer exactement. Ils ont un autre avantage, c'est que l'on peut faire varier l'épaisseur dans les deux sens, en plus ou en moins, sans ajouter ni retrancher de liquide. *Moitessier* a fait construire par Hoffmann un appareil de ce principe. *Yvon*, quelques années plus tard, a imaginé et fait réaliser par Duboscq, « *un spectomètre à épaisseur variable* » un spectomètre à disposition analogue à celle du précédent appareil. Avec l'instrument d'Yvon on peut examiner l'urine à des épaisseurs variant entre 0 et 70 m.m.

Cette épaisseur est insuffisante dans la plupart des cas pour l'urine. Aussi *Hénocque* a-t-il fait construire en 1890 un dispositif, qui permet d'examiner une plus grande épaisseur de liquide (de 1 à 10 cent.). C'est « *l'urospectroscope* ».

Enfin, plus récemment en 1896, un chimiste, *M. Gautrelet*, a dénommé « *urobilinomètre ou pigmentomètre* » un spectroscope à épaisseur variable, gradué de telle façon qu'il suffit de lire sur un disque horizontal divisé, pour

avoir immédiatement la quantité d'urobiline par litre, du moins en théorie.

Hénocque, dont les travaux en spectroscopie, font autorité, déclare que « malheureusement tous ces procédés sont passibles des mêmes objections ; ils peuvent être employés avec utilité entre des mains exercées, pour l'urobiline en solutions, mais ils ne donnent pas des indications rigoureuses pour l'urine où les phénomènes sont bien moins nets et où ils sont souvent obscurcis par la présence de divers pigments ». Tout ce que l'on peut en attendre, c'est l'indication générale qu'une urine contient *peu* ou *beaucoup* d'urobiline.

Les mêmes reproches s'adressent à un procédé récent décrit par *Auché*, sous le nom de *méthode de dosage de l'urobiline par les spectres superposés*. Tout en reconnaissant son ingéniosité, nous ne nous attarderons pas à décrire cette méthode, car les résultats auxquels elle conduit ne sont pas des *dosages* exacts, mais seulement des approximations bien relatives.

Les mêmes critiques s'appliquent au dosage par *le spectre minimum de Deroide*.

On peut rapprocher de ces procédés spectroscopiques, la méthode, imaginée par Viglezio, méthode complexe qui dose l'urobiline d'une part, par la constatation au spectroscope de la raie de l'urobiline, d'autre part, par l'apparition de la fluorescencedans un réactif approprié ammoniaco-zincique. C'est un procédé d'une exécution très délicate, entaché de toutes les causes d'erreur inhérentes aux méthodes spectroscopiques. De plus un autre défaut très important réside dans la méthode d'extraction de l'urobiline, défectueuse en principe et qui exige en outre des manipulations complexes, au cours desquelles, il est inévitable qu'une partie de l'urobiline extraite ne soit perdue.

Quant aux dosages, *par les procédés colorimétriques*, ils sont encore moins recommandables. Le type peut en être fourni par la méthode de *Studenski*, dont voici le principe d'après Hénocque. A 20 centimètres cubes d'urine, on ajoute 2 centimètres cubes de la solution de sulfate de cuivre saturée à froid, puis du sulfate d'ammoniaque cristallisé jusqu'à saturation, enfin 10 centimètres cubes de chloroforme; on agite quelques minutes, le chloroforme se colore en rouge; on le sépare.

Par comparaisons avec des solutions graduées d'avance, on peut juger d'après l'intensité de la coloration de la proportion d'urobiline.

La solution chloroformique contient d'abord des substances colorantes autres que l'urobiline; de plus l'impossibilité de conserver des solutions titrées d'urobiline sont autant de raison pour rejetter une telle méthode, qui ne peut prétendre en tout cas qu'à des résultats bien approximatifs.

M. Denigès a décrit un procédé voisin qui, s'il n'est pas passible du premier reproche, puisque à l'aide d'un réactif spécial mercurique, il isole l'urobiline des autres pigments, est passible du second. Il se sert en effet de solutions aqueuses d'urobiline pure que l'on ne peut conserver. De plus le dosage spectrophotométrique qu'il préconise fait intervenir dans l'appréciation des couleurs à l'échelle colorimétrique un coefficient personnel beaucoup trop important pour que les résultats de plusieurs observations puissent, non seulement avoir une valeur absolue, mais même être comparés entre eux.

3° *Dosage chimique de l'urobiline.*

Procédé de Bogomolow. — Cet auteur considère l'urobiline comme un acide faible, qui serait le dernier à se sa-

turer dans l'alcalinisation générale (?). Il neutralise donc un certain volume d'urine et reconnaît que l'urobiline n'est pas encore saturée, à la présence de son spectre acide et à la teinte verte que produisent quelques gouttes de sulfate de cuivre au millième. Il ajoute alors une solution titrée et étendue de soude jusqu'à ce qu'il obtienne, à la fois, le spectre alcalin, la fluorescence verte et une couleur rouge par addition de sulfate de cuivre. La quantité de solution titrée de soude qu'il a dû ajouter donne celle de l'urobiline.

Nous ne nous attarderons pas à critiquer une pareille théorie purement hypothétique et ne reposant sur aucune base scientifique sérieuse.

2. — Dosage de la stercobiline.

Cette question est toute nouvelle et les travaux sur ce sujet sont peu nombreux. En principe, on peut dire que tous les procédés de dosage de l'urobiline que nous venons de décrire sont applicables à la stercobiline, à condition simplement de modifier les procédés d'extraction.

Nous citerons cependant quelques travaux spéciaux et en particulier la méthode de *Müller* et celle de *Saillet*. Nous ne décrirons pas en détail ces procédés, la partie la plus intéressante concerne en effet l'extraction de la stercobiline et nous y reviendrons ultérieurement. Qu'il nous suffise de dire que *Müller* après des manipulations multiples, longues et surtout dangereuses pour la stercobiline arrive à obtenir un extrait chloroformique de cette substance. Il laisse alors évaporer le chloroforme et pèse le résidu sec ainsi obtenu. C'est donc simplement le procédé des pesées de Hoppe-Seyler. Le reproche que nous adressions à cet auteur s'applique à Müller, et le poids total du

résidu sec comporte bien autre chose que la seule stérécobiline.

Quant à *Saillet*, il obtient lui aussi, en définitive, un extrait chloroformique de stercobiline. Dans une cuve d'une épaisseur de 15 millimètres, il en verse un certain volume et il y ajoute de l'alcool absolu jusqu'à ce que s'éteigne au spectroscope la raie caractéristique de la sterécobiline. Cette méthode est passible des mêmes objections que celles que nous formulions précédemment à l'égard des méthodes spectroscopiques à propos de l'urobiline.

Tels sont en résumé les principaux auteurs, qui se sont efforcés de résoudre cette difficile question des dosages de l'urobiline et de la stercobiline. Malgré la multiplicité des travaux à ce sujet, qu'il nous soit permis de dire en terminant cette courte revue critique, que la question reste entière et qu'aucun des procédés que nous venons de décrire ne peut avoir la prétention d'effectuer un dosage rigoureux, du pigment de Jaffé.

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODE PERSONNELLE DE DOSAGE DE L'UROBILINE ET DE LA STERCOBILINE

CHAPITRE PREMIER

La Fluorescence base fondamentale de notre méthode de dosage

I. — La Fluorescence en général

Au début de nos recherches, nous nous sommes demandé, si nous ne tenterions pas à notre tour, après tant d'autres, de fonder une méthode de dosage de l'urobiline et de la stercobiline sur la spectroscopie et nos premiers essais ont été effectués dans ce sens. Mais convaincu bientôt de l'inanité de nos efforts, nous avons abandonné l'usage du spectroscope comme moyen de dosage pour plusieurs raisons, dont nous citerons ici les trois principales.

D'abord le maniement du spectroscope est délicat et demande une habitude, que certains acquièrent très difficilement.

De plus il intervient dans l'appréciation du moment d'apparition de bande minima de l'urobiline des divergences considérables avec chaque observateur. Ces divergences, négligeables peut être pour la simple recherche de ce pigment, deviennent capitales dans une méthode de dosage, puisqu'elles peuvent faire varier l'appréciation

de la quantité d'hydrobilirubine dans des proportions considérables.

La troisième objection plus importante est la suivante : avec des solutions titrées d'urobiline, on peut à la rigueur arriver à des résultats approximatifs, mais lorsqu'on s'adresse à l'urine et aux matières fécales, il y a à côté de l'urobiline et de la stercobiline, quantité de pigments, de substances colorantes diverses, qui viennent ou masquer, ou transformer, ou rendre méconnaissable le spectre de l'hydrobilirubine et empêcher le dosage.

Ne pouvant nous adresser au spectroscope, nous avons eu l'idée de faire reposer notre méthode de dosage sur une propriété physique, essentielle de l'urobiline et de la stercobiline : *la fluorescence*.

La fluorescence ? c'est-à-dire cette belle teinte dichroïque, phosphorescente par instants, à reflets plus ou moins verdâtres ou mordorés que prennent les solutions d'urobiline et de stercobiline en présence d'un sel de zinc.

Quoi de plus pathognomonique en effet que l'apparition de cette réaction indiscutable et qui ne peut prêter, elle, ni à confusion, ni à discussion et qu'il suffit d'avoir vu une seule fois pour toujours la reconnaître au premier coup d'œil.

Netteté manifeste de cette réaction, *facilité* évidente pour tous de sa constatation, sont déjà deux arguments puissants en faveur de la fluorescence. Nous en trouvons un troisième dans sa *sensibilité délicate*.

Pendant longtemps, tous les auteurs qui se sont occupés de cette question ont considéré le spectroscope comme le moyen le plus sensible de déceler des traces d'urobiline ! Beaucoup pensent encore ainsi. Or, nos recherches personnelles nous ont montré que la bande caractéristique de

l'urobiline n'apparaissait au spectroscope, qu'avec une quantité de pigment bien supérieure à celle nécessaire pour déterminer la fluorescence. Et, d'une façon générale, nos dosages nous mettent en mesure d'affirmer, que la sensibilité de la réaction fluorescente est à celle du spectroscope comme un est à trois, surtout, si comme nous, on recherche cette fluorescence à la lumière artificielle suivant un procédé que nous exposons plus loin.

Enfin, dernier et capital argument : le choix de la fluorescence *simplifie les procédés d'extraction* de l'hydrobilirubine. Une des plus grandes difficultés qu'aient eu à résoudre la plupart de ceux qui se sont essayés au dosage de l'hydrobilirubine, c'est en présence d'urines ou de matières fécales contenant à la fois des pigments biliaires et de l'hydrobilirubine, d'arriver à séparer ces deux substances l'une de l'autre. De là la nécessité de manipulations chimiques toujours compliquées, ne permettant souvent qu'imparfaitement cette séparation ou ne la permettant, qu'en détruisant une notable proportion de l'hydrobilirubine, déjà perdue parfois, en partie, au cours et du fait seul de ces interminables opérations. Rappelons à ce sujet les procédés de Salkowski, d'Huppert, d'Hammarsten, d'Arnold, de Biffi, de Nakayama, de Grimbert, de Denigès, etc., qui tous sont fondés sur des techniques compliquées.

Or, avec la fluorescence comme base de dosage de l'hydrobilirubine, point n'est besoin de se préoccuper des matières colorantes de l'urine ou des fèces et en particulier des pigments biliaires. Peu importe, que ces pigments soient mélangés à la solution d'hydrobilirubine à doser, s'ils ne peuvent, ainsi que nous nous en sommes assurés personnellement, traités de la même façon, pro-

duire une réaction fluorescente. Les recherches d'Auché, de Grigaut confirment les nôtres à ce pointde vue spécial. Bien plus, la présence des pigments biliaires dans la solution d'hydrobilirubine à doser ne gênera en rien la production de la belle fluorescence verte, pathognomonique de la présence d'hydrobilirubine, tout au moins dans la grande majorité des observations cliniques (1)

Et de cette façon, comme nous le verrons ultérieurement, on réduit au maximum les manipulations chimiques destinées à extraire l'hydrobilirubine de fèces et de l'urine, et, de ce fait, on est dans l'impossibilité soit d'altérer le pigment, soit d'en perdre même une faible partie.

Tels sont en résumé, les avantages indéniables qui plaident en faveur du choix de la fluorescence comme base du dosage de l'hydrobilirubine.

Ne peut-on lui faire quelques objections ?

Et tout d'abord ne peut-on confondre la fluorescence avec l'opalescence ?

Une telle confusion nous semble bien difficile, sinon impossible. Car en effet, qui dit opalescence, dit aspect de la pierre dénommée opale, c'est-à-dire liquide *trouble, laiteux*, *lactescent*, *chyliforme*, etc. *Or, la fluorescence ne s'accompagne pas de trouble et de plus elle a de beaux reflets verdâtres caractéristiques.*

Les physiciens fournissent du reste un moyen infaillible de différencier la fluorescence de l'opalence. Il suffit pour cela de placer le sommet du cône convergeant lumineux, émané d'une lentille au milieu du liquide et d'examiner ce faisceau à l'aide d'un nicol que l'on fait tourner sur son

(1) Il serait toujours facile, si dans quelques cas exceptionnels, certaines substances gênaient l'apparition de la fluorescense de s'en débarrasser. Nous y revenons plus loin.

grand axe. Si la lumière ne change pas pour les diverses positions du prisme, on a affaire à un liquide fluorescent ; autrement dit la lumière éclairant un liquide fluorescent pas n'est polarisée. Or la lumière éclairant un liquide opalescent étant polarisée, la distinction entre les deux phénomènes s'impose facilement.

Mais, en pratique, point n'est besoin d'un dispositif aussi compliqué ; il suffira de regarder pour savoir distinguer sans peine *une fluorescence claire, verte*, d'une *opalescence trouble et incolore.*

Mais, autre objection, n'y a-t-il pas en dehors de l'hydrobilirubine, des substances capables de produire la fluorescence ?

Nous venons de voir, en ce qui concerne les pigments biliaires qu'il ne peuvent en aucun cas, soit donner de la fluorescence, soit se transformer au cours de nos manipulations en hydrobilirubine. Nous n'y reviendrons pas.

En ce qui concerne les autres substances colorantes, physiologiques ou pathologiques, soit de l'urine, soit des matières fécales, la même réponse négative s'impose, du moins en l'état actuel de nos connaissances ; il ne saurait y avoir aucun doute et tout le monde est d'accord à ce sujet.

Parmi les substances introduites accidentellement dans l'organisme, certaines pourraient induire en erreur, et nous citerons en particulier la quinine, l'éosine, les fluorescéines.

Il est facile en interrogeant le sujet soumis au dosage, de savoir s'il a absorbé volontairement ou involontairement l'une ou l'autre de ces substances ?

Mais de plus aucune des diverses substances que nous venons de citer n'est capable de donner la fluorescence

verte de l'hydrobilirubine. En effet, tandis que la fluorescence de la quinine est *bleutée*, celle de l'éosine est *rougeâtre*, et celle de la fluorescéine est *jaunâtre*. Il suffit d'avoir recherché et comparé entre elles une seule fois ces diverses fluorescences, pour ne jamais plus les confondre ultérieurement.

Si l'on avait malgré tout des doutes sur la nature de la fluorescence obtenue, il reste un moyen de contrôle toujours facile : le spectroscope, qui montre dans les cas positifs, la bande caractéristique de l'hydrobilirubine.

Aussi posons-nous comme *règle générale* que notre procédé de dosage, basé sur la fluorescence, doit être fait toujours sous le contrôle permanente du spectroscope.

2. — Réactif spécial, révélateur de la fluorescence.

On a proposé bien des procédés pour mettre en évidence dans une solution contenant de l'hydrobilirubine, la fluorescence verte caractéristique. On peut citer ceux de Merletti, de Katz, de Nencki, de Zoja, d'Oliviero, de Lépinois, de Lemaire, de Roman Delluc, de Gérard, de Denigès, d'Auché, etc.

Mais la méthode classique, celle qui jouit toujours de la faveur générale, est celle de Riva une des plus anciennes.

On procède de la façon suivante. Dans un verre à pied, on agite fortement parties égales d'urine et d'alcool amylique. On laisse reposer, puis on décante l'alcool qui s'est séparé de l'urine et on ajoute quelques gouttes d'une solution de clorure zinc ammoniacal. On voit alors apparaître une belle fluorescence verte.

Cette méthode excellente donne, en règle générale, de très bons résultats

Mais le chlorure de zinc, agent révélateur de la fluorescence, présente de sérieux inconvénients. Tout d'abord, il ne produit la fluorescence qu'en milieu alcalin et cette exclusivité peut être très gênante.

En second lieu, les composés minéraux de l'urine sont susceptibles de se combiner avec le chlorure de zinc, et la réaction ne se produit plus (Riva-Nenki-Zoja, Merletti).

Quand l'urine est acide, que l'ammoniaque est saturé le chlorure de zinc se reprécipite. Si au contraire l'urine est alcaline avec le chlorure de zinc, les phosphates terreux donnent un précipité de phosphate trizincique $(PO^4)^2 Zn^3$. apparaissant dans le tube, sous l'aspect de flocons gélatiniformes. Leur couleur blanc-bleuâtre, superposée à celle de la liqueur, donne des reflets verdâtres faisant croire à une légère fluorescence. En filtrant, elle disparaît.

Il faut donc pour qu'on puisse affirmer la fluorescence, par le chlorure de zinc ammoniacal que cette coloration persiste après filtration.

C'est pour obvier à ces inconvénients que Roman Delluc utilise l'acétate de zinc, qui a la propriété de produire la fluorescence en milieu acide. Il a en outre, l'avantage de dissoudre le phosphate zincique et d'éviter ainsi une fausse fluorescence, causée par la précipitation de ce sel.

Nous avons essayé la plupart des sels de zinc et deux surtout nous ont donné de bons résultats : l'acétate et le valérianate de zinc. L'un et l'autre présentent les mêmes avantages, mais en pratique nous accordons une légère préférence au valérianate de zinc.

Préparation du réactif au valérianate de zinc. — Cette préparation est très simple. On prend un litre d'alcool à 60° et l'on y ajoute 50 centigrammes de valérianate de zinc.

On agite fortement à plusieurs reprises et on laisse reposer pendant 24 heures.

Le valérianate de zinc étant très peu soluble dans l'alcool, 50 centigrammes sont largement suffisants pour saturer 1 litre d'alcool.

Au bout de ce temps, on filtre sur un filtre à trame serrée (filtre Laurent). Le réactif apparaît clair et limpide et l'on peut s'en servir immédiatement.

Recommandation essentielle : Se servir d'un alcool à 60°, complètement incolore.

Nous avons choisi l'alcool à 60° pour trois raisons :

1° Parce que avec un alcool de ce degré, on obtient de très belles fluorescences ;

2° Parce que le valérianate de zinc est d'autant moins soluble que le titre de l'alcool est plus élevé. Se servir d'un alcool d'un titre plus élevé que l'alcool à 60°, c'est donc diminuer la quantité du sel en dissolution et c'est par le fait même gêner la production de la fluorescence qui ne se produit bien, qu'avec une quantité suffisante de valérianate de zinc. Le titre de 60° paraît être le titre de choix;

3° Parce qu'enfin procédant à l'extraction de l'urobiline ou de la stercobiline par l'alcool amylique, l'alcool à 60° se mélange intimement à ce dernier, ce qui facilite singulièrement la production et l'observation de la fluorescence.

3. — La fluorescence observée à la lumière artificielle.

Ayant fait choix de la fluorescence pour doser l'urobiline, nous eûmes tout d'abord l'idée de rechercher cette propriété caractéristique en nous servant de la lumière du jour Quelques tentatives dans ce sens, nous montrèrent bientôt, que nous faisions fausse route. Et nous nous

aperçûmes, entre autres obstacles, que le même dosage variait en apparence d'une heure à l'autre et cela du fait seul des variations de la lumière solaire : la fluorescence apparaissant d'autant mieux que la lumière est plus intense et inversement. Il était donc de toute nécessité d'observer cette fluorescence avec un éclairage d'une intensité fixe, invariable, toujours égale à elle-même.

Il est bien évident qu'un tel éclairage ne pouvait être fourni par la lumière solaire et que nous devions demander la solution du problème à un éclairage artificiel.

D'autant que dès 1903, W. Schlesinger avait remarqué que pour rendre évidente, une fluorescence à peine marquée, il suffit d'éclairer le liquide avec une lentille, transmettant les rayons lumineux fournis en l'espèce par une petite lampe électrique de poche : « On voit alors se former dit-il, dans la solution une boule lumineuse verte. »

Cette constatation nous sembla intéressante et c'est en nous inspirant de cette idée que nous avons imaginé, tout d'abord un dispositif spécial dans lequel la source éclairante était représenté par un manchon incandescent, alimenté soit par le gaz, soit par l'alcool. Mais nous nous sommes convaincu bientôt que ni le gaz, ni les vapeurs d'alcool ne pouvaient remplir les conditions exigées, c'est-à-dire fournir d'abord une intensité lumineuse invariable et cela malgré les régulateurs les plus perfectionnés. Et nous avons dû abandonner ces deux modes d'éclairage.

C'est l'électricité qui devait résoudre le problème à notre entière satisfaction. C'est en effet l'arc électrique ordinaire qui, en pratique, nous a donné les meilleurs résultats; en particulier autrement satisfaisants, que ceux fournis par la lampe Nernst, d'une intensité lumineuse insuffisante. Nous utilisons donc comme source éclairante, un petit arc

électrique que nous plaçons au foyer d'une lentille biconvexe de façon à obtenir au-delà de la lentille, des rayons lumineux parallèles. En interposant sur le trajet de ces rayons, la solution à examiner et en se plaçant dans l'obscurité, on réalise le principe général de l'appareil que nous décrivons plus loin qui permet de déceler des fluorescences indiscutables que la lumière du jour n'eut même pas permis de soupçonner.

Les avantages d'un tel dispositif peuvent, au total, se grouper sous deux chefs principaux :

1° Il fournit une intensité lumineuse fixe invariable et met ainsi à l'abri d'une des causes d'erreur les plus importantes, à savoir les variations du moment d'apparition de la fluorescence avec les variations mêmes de l'intensité lumineuse de la source éclairante.

2° Il est d'une sensibilité très délicate. Nous avons pu calculer que la sensibilité de ce dispositif était, au minimum, cinq fois plus grande que celle de la lumière du jour et trois fois plus grande que celle du spectroscope. Ce qui revient à dire qu'il faut cinq fois plus d'hydrobilirubine pour faire apparaître la fluorescence à la lumière du jour et que le spectroscope ne laisse apparaître la bande caractéristique de ce pigment, qu'avec une quantité d'hydrobilirubine trois fois plus considérable.

Telles sont, brièvement exposées, les raisons pour lesquelles nous avons cru pouvoir baser notre procédé de dosage de l'hydrobilirubine, d'une part, sur le phénomène de la fluorescence et, d'autre part, sur la constatation de cette fluorescence, non plus à la lumière solaire, mais à la lumière artificielle d'un arc électrique, donnant une intensité lumineuse fixe, cette fluorescence étant révélée par un réactif à base de valérianate de zinc.

CHAPITRE II

Description de l'appareil de dosage.

Pour arriver à effectuer notre dosage, nous avons été amené à faire construire un appareil que nous allons maintenant décrire dans ses lignes essentielles. Les deux dessins que nous avons fait reproduire ci-contre permettront de suivre plus commodément notre description.

Cet appareil se compose essentiellement de deux parties bien distinctes : d'une part, un dispositif spécial d'éclairage et, d'autre part, l'appareil de dosage proprement dit.

I. — Dispositif spécial d'éclairage artificiel et son support.

Nous avons utilisé, pour réaliser ce dispositif, une lanterne à projection ordinaire avec son système optique habituel, donnant, au sortir de la lanterne, des rayons lumineux parallèles.

Quant à la source lumineuse elle-même, nous avons déjà dit que la nécessité absolue d'avoir une intensité lumineuse invariable, nous avait, après des essais infructueux, fait rejeter l'emploi du gaz et de l'alcool. En outre, la nécessité d'avoir une source lumineuse d'une grande intensité, ne nous a pas permis d'utiliser la lampe électrique Nernst.

Notre choix s'est donc porté, en définitive, sur l'arc électrique. Nous avons fait choix d'un petit arc électrique, que nous branchons directement sur la canalisation de la

ville. L'interposition d'un rhéostat permet, du reste, d'adapter l'appareil aux principaux voltages usuels.

Nous avons pensé qu'il était inutile de faire exécuter un dessin de ce dispositif, puisqu'il s'agit, en somme, d'un appareil que tout le monde connaît : une lanterne à projection ordinaire éclairée par un arc électrique.

2. — L'Appareil proprement dit ou hydrobilirubinomètre.

Il est constitué essentiellement, ainsi qu'en témoigne la figure I qui le représente dans son ensemble, de deux parties principales :

1° une chambre noire renfermant deux cuves à glace.

2° une burette spéciale,

que nous allons décrire séparément :

I. *La chambre noire renfermant les deux cuves à glace.*

a) *La chambre noire.* — C'est une caissette en bois rectangulaire, que la figure II reproduit exactement.

Sur une de ses faces latérales, on remarque une circonférence métallique, qu'un système de vis à baïonnette permet d'adapter sur la lunette de la lanterne à projection; l'orifice placé au centre de cette circonférence est destiné précisément à livrer passage aux rayons condensés et parallèles, émanés de cette lanterne. Un peu au-dessus de cette circonférence métallique, et toujours sur la même face, on aperçoit un crochet destiné à maintenir fermé, au moment du dosage, la face supérieure de la chambre noire, mobile sur deux charnières.

Sur la face latérale opposée, on voit un support maintenant en place la burette graduée.

Sur la face antérieure enfin, on remarque un cylindre

métallique qui n'est autre qu'un viseur creux, placé lui-même en face d'un orifice percé sur cette face même. Grâce à ce dispositif, l'œil de l'observateur pourra plonger à l'intérieur de la chambre noire éclairée et suivre les diverses étapes du dosage.

b) *Les deux cuves à glace.* — A l'intérieur de cette chambre noire, sont placées deux cuves à glace. Ces cuves rectangulaires sont construites en glaces très limpides et très blanches dont les faces, rigoureusement planes sont soudées entre elles par un mastic spécial inaltérable.

Ces cuves sont placées côte à côte, et de telle façon, qu'elles sont l'une et l'autre à cheval sur l'orifice de la face antérieure sur lequel vient s'adapter le viseur par lequel regardera l'observateur.

Si bien que les rayons lumineux, émanés de l'arc électrique, transformés en rayons lumineux parallèles par le système optique de la lanterne à projection, exactement centrés par l'orifice dont est percé la face latérale de la chambre noire, qui vient s'adapter sur cette lanterne, éclairent

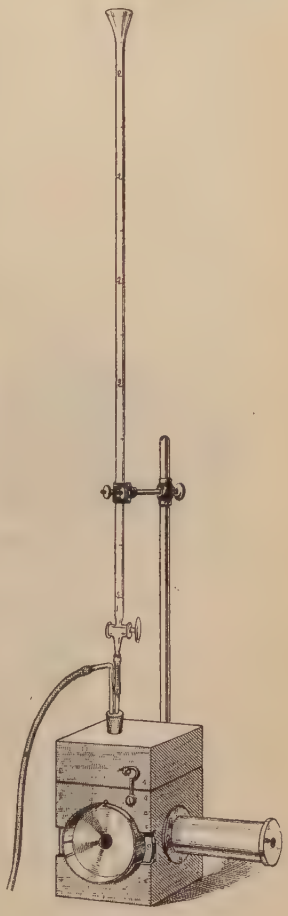

FIGURE I. — Vue d'ensemble de l'appareil de dosage.

les deux cuves à glace, de telle façon que le cylindre lumineux ainsi produit vient frapper les cuves à glace au point voulu pour permettre à l'œil de l'observateur, placé

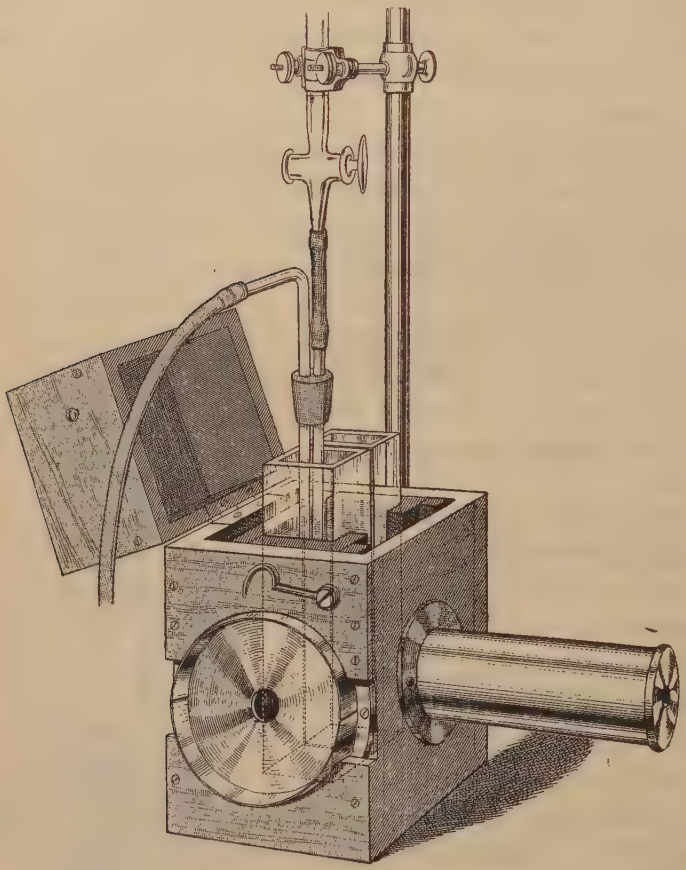

FIGURE II. — La chambre noire et les cuves à glace.

latéralement, d'effectuer le dosage. De ces deux cuves, une seulement est utilisée à vrai dire pour le dosage, c'est celle qui est placée à la gauche de l'observateur au mo-

ment où celui-ci regarde par le viseur. Quant à la deuxième cuve, c'est une cuve témoin qui renferme un liquide de comparaison.

Nous avons essayé de réaliser et de placer dans cette cuve une solution liquide verte reproduisant la teinte étalon qu'il eut fallu exactement reproduire dans la cuve où s'effectue le dosage pour que ce dosage soit terminé. Nous n'avons jamais pu trouver une solution réalisant une teinte analogue à celle de la fluorescence verte et claire de l'hydrobilirubine. Nous nous contentons dès lors de placer dans la cuve témoin, un liquide incolore, destiné à faire contraste avec la fluorescence de la cuve voisine et à permettre à l'observateur de mieux apprécier le moment d'apparition de la fluorescence-limite que nous définirons ultérieurement (1).

II. *La burette spéciale graduée en centièmes de centimètre cube.*

Dans son ensemble, cette burette, représentée en entier fig. 1, n'est autre chose qu'une burette de Mohr d'une graduation beaucoup plus délicate. En effet dans cette burette chaque centimètre cube est divisé en 100 parties égales; ce qui revient à dire qu'il faut 100 divisions pour faire un centimètre cube. Elle est d'une contenance totale de 5 cent. cubes soit 500 divisions ou centième de centimètres cube.

Son extrémité supérieure se termine par un évasement en forme d'entonnoir, destiné à faciliter l'introduction du liquide à son intérieur.

(1) Nous espérons solutionner ce problème à l'aide d'un verre coloré qui représenterait la teinte étalon que l'expérimentateur devrait reproduire pour réaliser le dosage; mais cette question est encore à l'étude.

A la partie inférieure se trouve un robinet prolongé par un tube de verre très effilé sur lequel vient s'adapter un petit tube de caoutchouc. Un embout en verre termine le tout. Cet embout pénètre au travers d'un bouchon en caoutchouc qui vient obturer sur le couvercle de la chambre noire un orifice destiné à le recevoir. Il est placé de telle façon qu'il conduit l'embout de verre dans la cuve à glace la plus rapprochée de la source éclairante et permet d'y faire écouler le contenu de la burette. Ce même bouchon est perforé d'un deuxième orifice dans lequel s'engage un petit tube de verre terminé par un tube de caoutchouc, le tout étant destiné à agiter le contenu de la cuve par insufflation.

Cette burette est maintenue en place par un support métallique, qui prend appui sur l'une des faces latérales de la chambre noire.

CHAPITRE III

Les préliminaires du dosage.

1. — Principe général.

I. — Etant donnée d'une part, une solution titrée d'hydrobilirubine renfermant 1 centigramme d'hydrobilirubine pour 100 grammes d'alcool amylique et dénommée solution-étalon.

Etant donné d'autre part, un réactif spécial, révélateur de la fluorescence ;

Combien faudra-t-il de centièmes de centimètre cube de cette solution-étalon, mesurés à l'aide de la burette spéciale, pour faire apparaître la fluorescence verte et claire immédiate ou fluorescence-limite dans une cuve à glace, renfermant un volume invariable de 10 centimètres cubes de réactif révélateur ? Cette fluorescence-limite étant recherchée à la lumière artificielle, fournie par un dispositif spécial d'éclairage latéral à intensité lumineuse fixe.

Il faudra N divisions, soit N centièmes de centimètres cubes qu'un calcul très simple convertira en un chiffre x réprésentant en poids la quantité d'hydrobilirubine nécessaire et suffisante pour faire apparaître la fluorescence-limite.

II. — Etant donnée d'une part, une solution d'alcool amylique, ayant repris par une technique spéciale toute l'urobiline ou toute la stercobiline d'une urine ou d'une matière fécale données ;

Etant donné d'autre un réactif spécial révélateur de la fluorescence ;

Combien faudra-t-il de centièmes de centimètre cube de cet extrait à doser, mesurés à l'aide de la burette spéciale pour faire apparaître la fluorescence verte et

claire immédiate ou fluorescencelimite dans une cuve à glace renfermant un volume invariable de 10 centimètres cubes de réactif révélateur, en recherchant cette fluorescence à la lumière artificielle à l'aide de l'appareil déjà décrit?

Or, nous savons que pour que la fluorescence-limite apparaisse, il faut qu'il y ait dans les 10 centimètres cubes de réactif révélateur, un chiffre X représentant un poids invariable, établi une fois pour toute d'hydrobilirubine.

Il suit de là que le nombre de centièmes de centimètres cube de la solution à doser, variable avec chaque cas et nécessaire pour faire apparaître cette fluorescence-limite permettra grâce à une formule très simple, que nous établissons plus loin, de donner le poids de l'hydrobilirubine contenue dans les urines ou les fèces à examiner.

2. — Solution-étalon d'hydrobilirubine.

Etant donné l'exposé général que nous venons de faire la nécessité d'établir une solution titrée d'hydrobilirubine apparaît clairement. Cette solution titrée, étalonnée, renfermant un poids connu d'hydrobilirubine nous a servi à établir le *dosage initial*, celui sur lequel reposera toute notre méthode.

Pour établir une telle solution-mère une hydrobilirubine chimiquement pure, cristallisée eut été nécessaire. Malheureusement un tel produit n'existe pas et jamais aucun chimiste n'a encore pu l'obtenir pratiquement.

Ne pouvant nous procurer — puisque elle n'existe pas — une hydrobilirubine pure nous avons cherché à en obtenir une aussi pure que possible. Sur les conseils autorisés de M. Grimbert, professeur à l'Ecole de Pharmacie, nous

avons rejeté l'hydrobilirubine ou urobiline obtenue par le procédé de Jaffé, manifestement entachée de trop d'impuretés et nous avons fait choix de l'urobiline en poudre de la maison Merck, obtenue par le procédé d'Hoppe Seyler, bien supérieure à la précédente. Ce n'est certainement pas une urobiline chimiquement pure, au sens absolu du mot, mais c'est à l'heure actuelle, celle qui se rapproche le plus de ce produit idéal.

Sans nul doute, il eut été préférable de pouvoir opérer avec un produit rigoureusement pur; mais comme nous ne pouvions nous servir d'un produit qui n'existe pas, force nous a donc été de nous rabattre sur l'hydrobilirubine de Merck.

D'autant qu'à tout prendre, peu importe. En effet, le produit commercialisé de Merck est un produit stable, toujours comparable à lui-même et son mode de préparation est bien connu. Dès lors, c'est une entité bien définie, une base fixe avec laquelle nous pourrons comparer utilement tous les résultats de nos dosages et cela, avec la certitude d'être compris par tout le monde et en donnant à tous, la possibilité d'avoir entre les mains le terme même de la comparaison, c'est-à-dire le contrôle même de nos résultats. Quant à ces résultats eux-mêmes ils ne pourront évidemment indiqner qu'un poids d'hydrobilirubine exprimé en hydrobilirubine de Merck, préparée d'après le procédé d'Hoppe-Seyler et non pas en urobiline pure. Si nous disons par exemple qu'une urine donnée renferme par litre 0,005 millim. d'urobiline, nous voulons dire d'urobiline de Merck et non pas d'urobiline cristallisée.

Fabrication de la solution-étalon. — Nous avons de-

mandé à la maison Merck *un centigramme* d'urobiline, rigoureusement pesé et vérifié.

A son arrivée au laboratoire il a été de nouveau pesé et vérifié par nous. Nous l'avons fait dissoudre dans l'alcool amylique, que notre expérience personnelle nous fait considérer comme le meilleur dissolvant de l'urobiline.

Une telle dissolution ne va pas sans quelques difficultés. Voici en pratique comment il faut opérer :

On prend un mortier de verre neuf sans aucune aspérité et l'on y verse le centigramme d'urobiline pesé et vérifié. On le pulvérise finement à sec, puis goutte à goutte et très lentement, on commence à verser l'alcool amylique en pulvérisant toujours l'urobiline. La dissolution est à peu près complète au bout d'un quart d'heure. On verse alors la solution obtenue dans un ballon jaugé et vérifié de 100 centimètres cubes. Avec de l'alcool amylique pur, on lave à plusieurs reprises le mortier, afin d'entraîner les dernières traces d'urobiline et l'on ajoute tous ces liquides de lavage dans le ballon jaugé, en ayant soin d'employer au total une quantité d'alcool amylique inférieure à 100 centimètres cubes.

A ce moment on porte la solution ainsi préparée dans un bain-marie à 50° et on l'y laisse séjourner une heure. Cette température trop basse pour agir d'une façon quelconque sur l'urobiline (nous nous en sommes personnellement assuré du reste) est cependant suffisante pour faire dissoudre les dernières traces de poudre d'urobiline et pour obtenir une dissolution absolument parfaite.

On filtre alors, puis on laisse refroidir et ce n'est que lorsque la solution est revenue environ à + 15° que l'on complète exactement le volume à 100 centimètres cubes.

On obtient ainsi une solution jaune ambrée renfermant

exactement 1 centigramme d'hydrobilirubine de Merck dans 100 centimètres cubes d'alcool amylique.

Nous avons fait plusieurs solutions analogues, dont certaines à près de deux ans d'intervalle; nous avons prié plusieurs chimistes de confectionner eux-mêmes des solutions analogues et nos essais ont été effectués avec ces multiples solutions de sources différentes et cela afin de nous entourer de toutes les garanties possibles. Les résultats obtenus ont toujours été sensiblement identiques.

3. — La fluorescence claire et verte immédiate ou fluorescence-limite.

Nous avons exposé déjà les raisons principales pour lesquelles nous avons choisi le valérianate de zinc pour déceler la fluorescence. Nous avons omis volontairement la plus importante, à savoir *la qualité* toute particulière de cette fluorescence. Nous nous expliquons.

Lorsqu'on fait tomber grâce à la barette spéciale dans les 10 centimètres cubes de réactif au valérianate de zinc quelques gouttes de la solution étalon d'hydrobilirubine, on voit se succéder deux phases très nettes dans l'évolution des phénomènes de la fluorescence.

Tout d'abord, on voit se produire dans le réactif, non pas un précipité, mais un léger louche. A mesure que l'on ajoute une à une quelques gouttes de la solution étalon d'urobiline, *le louche persiste mais sans augmenter*, tandis qu'apparaît simultanément une fluorescence progressivement plus intense. Soudain une goutte de plus et *le louche disparaît brusquement*, faisant place à une magnifique fluorescence *verte et claire*.

Donc en résumé, on assiste à une première phase de fluo-

rescence verte mais *trouble*, à laquelle succède (1) brusquement une fluorescence verte mais *claire*. Cette constatation nous semble précieuse pour délimiter ce que nous appelons la *fluorescence limite* ou *fluorescence type* sur laquelle repose toute la précision de notre méthode.

Or cette fluorescence-limite est atteinte pour nous lorsque à x gouttes de la solution étalon d'hydrobilirubine à un centigramme pour 100 nécessaires pour faire apparaître dans 10 centimètres cube de réactif au valérianate de zinc, *la fluorescence verte mais trouble*, une seule goutte de plus suffit à faire apparaître une fluorescence verte et *claire* immédiate. En d'autres termes, le dosage est terminé et la fluorescence-type ou limite est atteinte lorsque la fluorescence verte mais *trouble* fait place brusquement à une fluorescence verte mais *claire*.

Or, nous verrons ultérieurement qu'avec la solution étalon, titrée à un centigramme d'hydrobilirubine pour 100 centimètres cubes d'alcool apnylique, la fluorescence-limite ou fluorescence verte et claire immédiate apparaît dans les 10 centimètres cubes de réactif révélateur toutes les fois que ce réactif contient exactement 10 millionièmes de gramme d'hydrobilirubine.

Nous concluons donc de là, que toutes les fois que x centièmes de centimètre cube d'alcool amylique, ayant repris toute l'urobiline ou toute la stercobiline d'une urine ou d'une matière fécale donnée, feront apparaître dans 10 centimètres cube de réactif révélateur la fluorescence verte et *claire*, limite, type, le nombre de centièmes de centimètre cube x, variable avec chaque urine et chaque fèces, con-

(1) Les mêmes phénomènes se produisent du reste, ainsi que M. Grimbert l'a signalé depuis longtemps, avec l'acétate de zinc.

tiendra toujours en poids une quantité d'urobiline égale invariablement à 10 millionièmes de gramme.

On comprend aisément que x divisions varieront en plus ou en moins suivant la richesse ou la pauvreté en hydrobilirubine du liquide examiné et l'on comprend dès lors qu'il soit possible de trouver une formule générale qui permette avec cette donnée précise (x = 10 millionièmes de gramme d'hydrobilirubine) de calculer toute l'urobiline ou toute la stercobiline éliminées en 24 heures.

Nous établissons plus loin cette formule en détail.

Nous devons en terminant faire une remarque pratique importante. *La fluorescence claire* ne persiste pas très longtemps, et au bout de quelques instants un trouble se produit bientôt. Il y a donc intérêt à pratiquer le dosage aussi rapidement que possible et à ne pas s'interrompre avant d'avoir obtenu la fluorescence verte et claire ou fluorescence limite.

CHAPITRE IV

Manuel Opératoire

Nous venons d'exposer dans les pages qui précèdent les grandes lignes théoriques de notre méthode de dosage de l'hydrobilirubine ; il nous faut maintenant envisager le point de vue pratique et indiquer schématiquement les opérations successives que l'on doit réaliser pour atteindre ce but.

Tout dosage de l'hydrobilirubine comprend deux grandes étapes principales :

1° La détermination de ce que nous appelons la fluorescence limite à l'aide de la solution titrée d'hydrobilirubine ou en d'autres termes la quantité en poids d'hydrobilirubine de Merck (préparée d'après le procédé d'Hoppe-Seyler) nécessaire pour faire apparaître cette fluorescence-limite dans les 10 centimètres cubes de réactif révélateur.

2° Le dosage proprement dit de l'urine ou des matières fécales à examiner.

1. — Détermination à l'aide de la solution-étalon d'hydrobilirubine de la fluorescence-limite.

1° *Technique*

On procède de la façon suivante :

L'appareil de dosage tel que nous l'avons décrit, et l'appareil d'éclairage auquel il est annexé, sont placés commodément sur une table, en bon éclairage, le couvercle de la chambre noire étant relevé et la burette graduée ne plon-

geant pas dans la cuve à glace ; cela pour la commodité des manipulations. On lave préalablement la burette graduée en centièmes de centimètre cube avec de l'alcool, puis on y verse une petite quantité de la solution titrée d'hydrobilirubine et cela afin de se débarrasser des dernières traces de l'alcool de lavage.

Le robinet de la burette étant alors fermé, on remplit cette dernière avec la solution titrée ou solution-étalon, qui doit s'élever dans l'hydrobilirubinomètre jusqu'à la base de la portion terminale évasée, c'est-à-dire bien au-dessus de la division initiale O. Ouvrant alors le robinet, on fait échapper le liquide, de façon à ce que le ménisque supérieur vienne en regard de la division O.

Cette façon de procéder a l'avantage, grâce à l'écoulement du trop-plein de la burette, de chasser les bulles d'air qui s'accumulent fatalement au niveau et au-dessous du robinet.

A l'aide d'une pipette exactement calibrée, on aspire 10 centimètres cubes du réactif révélateur au valérianate de zinc et on l'introduit dans une des cuves à glace ; on remplit de la même façon la deuxième cuve. On vérifie une fois encore la position du ménisque supérieur du liquide dans la burette graduée, et si ce qui est la règle, il est remonté au-dessus du zéro, on le ramène soigneusement à la position voulue. Cela fait, à l'aide d'une feuille de papier buvard, on essuie avec précaution l'extrémité inférieure de la burette, afin de ne laisser aucune trace de solution à ce niveau.

On ferme alors le couvercle de la chambre noire et l'on adapte grâce à un tube de caoutchouc, l'extrémité inférieure de la burette sur l'embout en verre qui, passant au travers du bouchon perforé, vient pénétrer jusqu'à l'intérieur de la

cuve à glace qui se trouve la plus rapprochée de la source lumineuse. On sait qu'un deuxième trou percé dans ce bouchon permet à un tube de verre de pénétrer à l'intérieur de cette même cuve, afin de permettre par insufflation l'agitation de son contenu.

On allume à ce moment l'arc électrique et on le règle.

Puis, regardant à l'aide du viseur à l'intérieur de la chambre noire, l'observateur aperçoit les deux cuves à glace, accolées l'une à l'autre, éclairées toutes deux par un cylindre lumineux qui apparaît d'une *blancheur éclatante* sur le fond noir environnant, au sein même des 10 centimètres cubes de réactif révélateur placés dans les deux cuves.

Ouvrant alors le robinet de la burette graduée, on fait tomber lentement et une à une quelques gouttes de la solution étalon, tandis que en même temps on agite le mélange dans la cuve à glace par le petit appareil à insufflation déjà décrit. A mesure que les gouttes tombent dans les 10 centimètres cubes de réactif valérianique, l'observateur, regardant toujours par le viseur, voit se succéder les diverses colorations suivantes dans la cuve à glace placée à sa gauche, c'est-à-dire dans celle qui se trouve tout contre la source éclairante : tout d'abord le cylindre lumineux est d'une blancheur éclatante, puis une fluorescence légère se desine, mais à la fois verte et trouble ; peu à peu le vert et le trouble s'accentuent et enfin brusquement le trouble disparaît, la fluorescence claire et verte est atteinte. Le dosage est terminé, puisque la fluorescence-limite est obtenue.

Dans la cuve de droite au contraire, cuve de comparaison, le cylindre lumineux qui éclaire le réactif apparaît toujours d'une blancheur éclatante. Si on lit alors sur la burette graduée le nombre de divisions qu'il a fallu em-

ployée pour arriver à ce résultat, on voit que 10 centièmes de centimètre cube ont été nécessaires (1).

2° *Calculs*

Nous savons donc par l'opération que nous venons d'effectuer que 10 centièmes de centimètre cube de la solution étalon d'hydrolibirubine sont nécessaires pour faire apparaître dans les 10 centimètres cubes de réactif révélateur la fluorescence verte et claire immédiate ou fluorescence limite.

Or 100 centimètres cubes de la solution-étalon = 0,01 d'hydrobilirubine.

1 centimètre cube de la solution-étalon = 0,0001 d'hydrobilirubine.

1 centième de centimètre cube de la solution-étalon = 0,000001 d'hydrobilirubine.

et 10 centièmes de centimètre cube de solution-étalon = 0,000010 d'hydrobilirubine.

La fluorescence claire et verte ou fluorescence-limite se produit donc dans les 10 centimètres cubes de réactif avec 10 millionièmes de gramme d'hydrobilirubine. Par conséquent toutes les fois que l'on verra apparaître les 10 cents. cubes du réactif révélateur la fluorescence-limite, on sera assuré de se trouver en présence de 10 millionièmes de gramme d'hydrobilirubine. Nous ajoutons — et ceci est capital — non pas 10 millionièmes de grammes d'hydrobilirubine pure, produit qui n'existe pas, mais 10 millionièmes de

(1) L'ensemble de cette opération peut servir en outre à déterminer le titre exact de l'hydrobilirubine employée pour effectuer cette solution-étalon. Si pour obtenir la fluorescence limite il faut plus de 10 divisions c'est qu'on a affaire à une hydrobilirubine d'un titre inférieur à la nôtre, c'est-à-dire moins pure ; si au contraire il faut moins de 10 divisions l'hydrobilirubine employée est plus pure que la nôtre ; de toutes façons son titre est exactement déterminé.

gramme d'hydrobilirubine de Merck, obtenue par le procédé d'Hoppe-Seyler.

Il est bien évident que la détermination de ce chiffre sur lequel repose tous les calculs, est faite une fois pour toute, et qu'il ne saurait être question d'y revenir à propos de chaque dosage. Nous nous sommes livrés, à une série de vérifications, pour contrôler l'exactitude de ce résultat, Tout d'abord nous avons répété maintes fois ce dosage initial en nous servant de la même évolution titrée à 1 centigramme pour 100. En outre nous l'avons vérifié en opérant avec des dilutions de plus en plus étendues de cette solution mère. Nos résultats ont toujours été proportionnels entre eux et la fluorescence-limite s'est toujours sensiblement produite avec la même quantité d'hydrobilirubine.

2. — Dosage proprement dit.

Cette deuxième étape du dosage que nous allons décrire maintenant est en pratique la seule que l'on ait à réaliser, puisque, la première étape ayant été accomplie une fois, le chiffre obtenu, vérifié, ne change pas et reste toujours égal à lui-même soit : 10 millionièmes de gramme d'hydrobilirubine.

Cette deuxième étape se subdivise elle-même en deux temps principaux : l'extraction de l'urobiline et de la stercobiline et le dosage proprement dit de l'extrait ainsi obtenu.

1° *Procédé d'extraction dans l'urine et les fèces de l'urobiline et de la stercobiline.*

La condition essentielle pour réaliser un dosage exact de l'hydrobilirubine, c'est d'extraire de l'urine ou des fèces à examiner *toute* l'hydrobilirubine. C'est aussi une des conditions les plus difficiles à remplir, ainsi qu'en témoigne l'examen attentif de la plupart des procédés de dosage du pigment de Jaffé. Les uns s'exposent à laisser perdre de l'hydrobilirubine au cours de manipulation chimiques trop complexes, les autres se condamnent à altérer une partie de cette hydrobilirubine par l'adjonction de réactifs chimiques, employés dans des buts divers, d'autres enfin n'arrivent, du fait de l'insuffisance de leur technique, qu'à extraire une partie seulement de l'hydrobilirubine totale.

Notre but a été de prouver un procédé qui remplisse les trois conditions suivantes, essentielles :

1° Etre simple et clinique ;

2° Etre capable d'extraire toute l'urobiline, toute la stercobiline et leurs chromogènes ;

3° Etre incapable, du fait des réactifs ou des manipulations chimiques employés, de détruire ou de perdre une partie même minime de l'hydrobilirubine.

Nous espérons avoir atteint ce triple but.

I. — Principe de la méthode.

a). Technique générale. — Précipiter toute l'urobiline ou toute la stercobiline d'une urine ou d'une matière fécale donnée par le sulfate d'ammoniaque en milieu acide, oxyder leurs chromogènes par la liqueur iodo-iodurée de Lügol, reprendre ensuite par l'alcool amylique l'hydrobilirubine ainsi précipitée et obtenir en définitive un extrait alcoolo-amylique, ayant repris toute l'hydrobilirubine de l'urine et des fèces données.

2° *Instrumentation.*

Les objets nécessaires pour effectuer l'extraction de l'hydrobilirubine, tant de l'urine que des fèces sont très peu nombreux. Nous citerons :

1° Une série d'ampoules à décantation munis d'un robinet et de contenances variables : 1 litre, 500 cent. cubes, 400 cent. cubes, 300 cent. cubes par exemple. Ces ampoules se trouvent très facilement dans le commerce ;

2° Des supports appropriés à chacune de ces ampoules.

3° Deux éprouvettes graduées, l'une de 100 centimètres cubes et l'autre de 10 centimètres cubes ;

4° Cristallisoirs, entonnoirs, verres à pied, agitateurs, balances, mortier, filtres, etc.

3° *Manuel opératoire.*

A. Urines. — 1° On recueille soigneusement la quantité des urines des 24 heures d'un sujet donné et on note ce volume total exactement mesuré ;

2° On en filtre 100 centimètres cubes dans une éprouvette graduée et on l'acidifie avec 5 gouttes d'une solution d'acide sulfurique à 1 pour 100.

3° On pèse 60 grammes de sulfate d'ammoniaque et après l'avoir pulvérisé au mortier on l'introduit dans une ampoule à décantation.

4° Aux 100 centimètres cubes d'urine filtrée à examiner on ajoute 5 centimètres cubes de liqueur iodo-iodurée de Gram. On transforme ainsi par oxydation le chromogène de l'urobiline en urobiline.

5° On verse les 100 centimètres cubes d'urines, renfermant 5 centimètres cubes de liqueur de Gram, dans l'ampoule à décantation, contenant déjà les 60 grammes de sulfate d'ammoniaque pulvérisé. On bouche soigneuse-

ment l'ampoule et on agite *longuement* et à *plusieurs reprises*. On voit alors l'urobiline se précipiter sous forme de petits flocons jaunâtres au contact du sulfate d'ammoniaque. On laisse ainsi l'urine en présence de ce sel pendant 2 heures environ, en ayant soin d'agiter le mélange à plusieurs reprises, durant ces 2 heures. On constate au bout de ce temps qu'une petite partie du sulfate d'ammoniaque non dissout, s'est déposé dans le fond de l'ampoule, tout contre le robinet. C'est la preuve que le mélange *est saturé* de sulfate d'ammoniaque, condition essentielle pour que *toute* l'urobiline soit précipitée.

6° Au bout d'une heure on ajoute au mélange 50 centimètres cubes d'alcool amylique pur et incolore. On agite en tous sens plusieurs fois de suite, au total 4 ou 5 fois dans l'heure qui suit. L'alcool amylique dissout l'urobiline précipitée et l'entraîne de ce fait avec lui. La densité des 2 liquides étant différente, l'alcool amylique chargé de toute l'urobiline, se sépare du mélange et peut se rassembler à la partie supérieure de l'ampoule.

Au bout de 3 heures, la séparation est complète. Il est plus prudent d'attendre 5 ou 6 heures, et même, dans la pratique, nous attendons souvent au lendemain avant de reprendre la suite des manipulations, à condition toutefois de placer la solution à l'abri de la lumière solaire.

7° A ce moment, on se débarrasse de l'urine privée de son urobiline, en ouvrant le robinet de l'ampoule à décantation. Lorsque l'alcool amylique, chargé de toute l'urobiline, va s'échapper à son tour, on le reçoit dans un entonnoir sur un tampon d'ouate hydrophile.

8° On obtient ainsi une liqueur amylique d'un jaune d'or plus ou moins intense, ayant repris toute l'urobiline des 100 centimètres cubes d'urines données.

B) Fèces. — On recueille la totalité des fèces des 24 heures. On recommande au malade d'éviter soigneusement d'y mêler de l'urine.

2° On mélange intimement la totalité des fèces par trituration, afin d'avoir une masse bien homogène, de consistance et de composition identiques.

3° On prélève 25 grammes de ce mélange et on les déshydrate. Cette déshydratation peut s'obtenir de deux façons. Une première façon, la plus simple, mais aussi la plus longue, consiste à déposer ces 25 grammes de fèces dans une étuve à 37°. La déshydratation est terminée lorsque le poids du résidu final reste invariable. Une deuxième façon beaucoup plus rapide consiste à obtenir cette déshydratation par le vide. Malheureusement l'installation nécessaire est coûteuse et difficile à réaliser.

4° On pèse le résidu final ainsi obtenu et la différence entre ce poids et le poids initial de 25 grammes donne la quantité d'eau contenue dans les fèces.

5° On prélève *un gramme* de ce résidu final.

4° On place ce gramme de fèces déshydratées dans un mortier et on le triture avec 100 centimètres cubes d'eau distillée. La trituration doit être parfaite et il ne doit persister aucun grumeau dans le liquide, lorsque le mélange est terminé.

5° On pèse alors 50 grammes de sulfate d'ammoniaque, on le pulvérise et on l'introduit dans une ampoule à décantation ordinaire.

6° On verse dans cette ampoule, sur le sulfate d'ammoniaque, l'extrait liquide de 1 gramme de fèces déshydratées.

7° On y ajoute 5 centimètres cubes de liqueur iodo-iodurée de Gram. On oxyde ainsi le chromogène de la

stercobiline ou stercobilinogène et on le transforme en stercobiline.

8° On agite fréquemment, comme il a été indiqué pour l'extraction de l'urobiline, et cela pendant 2 heures.

9° On ajoute ensuite 50 centimètres cubes d'alcool amylique. On mélange intimement les deux liquides à plusieurs reprises à quelques instants d'intervalle. On laisse reposer 5 ou 6 heures, et si on a le temps 12 heures même à l'abri de la lumière scolaire. Au bout de ce temps la séparation des deux liquides est complète et l'alcool amylique est remonté à la partie supérieure de l'ampoule, ayant entraîné et dissout toute la stercobiline de 1 grammes de fèces déshydratées.

10° On ouvre le robinet de l'ampoule et après avoir laissé perdre le liquide de dilution, on recueille sur un filtre de coton hydrophile, l'alcool amylique teinté plus ou moins en jaune brun foncé par *toute* la stercobiline de 1 gramme de matières fécales déshydratées.

Il est indispensable avant de se livrer à cette série de manipulations, tant pour l'urobiline que pour la stercobiline d'effectuer auparavant un examen qualificatif qui permettra de savoir si une urine ou une matière fécale contiennent de l'urobiline ou de la stercobiline et d'apprécier grossièrement, si elles en contiennent peu ou beaucoup. Pour cela, on vérifiera toujours la présence de l'urobiline ou de la stercobiline par l'examen au spectroscope.

Cet examen qualitatif préalable a une certaine importance, car son résultat indiquera si en présence d'une urine ou de fèces, on ne doit pas, du fait de la pauvreté ou de la richesse, de ces excreta en hydrobilirubine, augmenter ou diminuer la quantité d'urines ou de fèces à examiner. On acquiert très vite cette notion après quelques examens.

Du reste, en pratique voici comment on peut opérer :

1° Ou bien l'examen préalable indique une teneur moyenne en urobiline ou stercobiline. On se comporte comme nous l'avons indiqué et l'on prend 100 centimètres cubes d'urines et 1 gramme de fèces.

2° Ou bien la teneur en urobiline ou stercobiline apparaît considérable on réduit alors la quantité d'urine à 50 cents. cubes et le poids des fèces à 0 gr. 50 centigr. et on ne change rien au reste de la technique.

3° Ou bien l'examen préalable indique une pauvreté notable des excreta en urobiline et stercobiline.

Dans ce cas on opère sur 250 centimètres cubes d'urine que l'on traite par 120 grammes de sulfate d'ammoniaque, et sur 5 grammes de fèces deshydratées que l'on sature avec 100 grammes de sulfate d'ammoniaque, le reste de la technique ne variant pas. On pourrait cependant abaisser de 50 à 25 centimètres cubes, la quantité d'alcool amylique destiné à extraire l'hydrobilirubine.

Nous devons faire remarquer d'autre part que dans certains cas rares et du fait de la présence dans les urines ou les fèces de certaines substances pouvant gêner l'apparition de la fluorescence, il peut être utile de se débarrasser de ces substances. Nous conseillons alors après avoir traité les urines ou les fèces avec le sulfate d'ammoniaque, en milieu acide, de recueillir le précipité d'hydrobiline formé sur un filtre et de le débarrasser de ses impuretés, en le traitant par le procédé d'Hoppe-Seyler, déjà décrit et sur lequel nous ne reviendrons pas. Qu'il nous suffise de dire que le résidu final, contenant une hydrobilirubine aussi épurée que possible sera traité par l'alcool amylique et que c'est avec cette liqueur amylique, contenant toute l'urobiline et toute la stercobiline débarrassées de leurs impuretés, qu'on procédera au dosage.

En pratique, c'est-à-dire en clinique, un procédé aussi complexe ne peut être utilisé que très exceptionnellement et par des expérimentateurs habitués aux manipulations chimiques. Au surplus, les nombreuses vérifications pratiquées par nous, nous ont montré l'inutilité de telles manœuvres et nous n'avons jamais eu l'occasion de constater avec certitude que des substances mal déterminées, pigmentaires ou autres, pouvaient gêner la fluorescence et modifier le dosage.

b) Modification de la technique permettant de doser séparément.

D'une part, l'urobiline et la stercobiline et d'autre part leurs chromogènes.

Il n'y a rien à changer à la technique générale que nous venons d'exposer. On fera la série complète des manipulations indiquées précédemment, mais sans ajouter les 5 centimètres cubes de liqueur de Gram, destinés à oxyder le chromogène.

On fera deux parts égales de la solution alcolo-amylique finale.

La première part, utilisée sans adjonction de liqueur de Gram, permettra de doser l'urobiline ou la stercobiline *seules*, sans leurs chromogènes, puisque ceux-ci n'auront pas été oxydés.

La deuxième part, de la solution amylique sera traitée par contre, par 5 centimètres cubes de liqueur iodo-iodurée, qui oxydera le chromogène et le transformera soit en urobiline, soit en stercobiline. Le dosage effectué dans ces conditions sera un dosage total de la stercobiline, de l'urobiline et de leurs chromogènes.

La différence entre le dosage de la première part (uro-

biline ou stercobiline seulement) et le dosage de la deuxième part (urobiline ou stercobiline + leurs chromogènes) donnera la proportion exacte de chromogène.

Le procédé général d'extraction que nous venons de décrire nous paraît atteindre le but que nous nous étions proposés :

1° *C'est un procédé simple et clinique.* — Nous ne croyons pas qu'on puisse plus simplement et plus facilement arriver au résultat cherché : *extraire toute l'urobiline.*

Si on le compare aux procédés compliqués de certains auteurs, à celui de Mya par exemple, d'une complexité inouïe ou à celui de Müller, si délicat et si dangereux pour l'urobiline, on est frappé par sa simplicité.

2° *C'est un procédé qui permet d'extraire toute l'urobiline, toute la stercobiline et leurs chromogènes.* — La preuve est facile à faire.

Pour cela, il suffit au moment où l'on veut séparer l'alcool amylique, qui a repris toute l'hydrobilirubine, de la solution d'urine ou de fèces, de recueillir *séparément cette solution initiale.* On l'examine alors au spectroscope et l'on peut se convaincre qu'elle ne présente plus trace de la bande caractéristique de l'urobiline.

Mieux encore, on peut à nouveau traiter cette solution comme si on n'en avait pas extrait l'hydrobilirubine et recommencer la même série d'opérations. On se rendra compte que l'alcool amylique de deuxième cuvée, s'il est permis de s'exprimer ainsi, ne présente plus aucune des réactions de l'urobiline ou de la stercobiline.

3° *C'est un procédé qui ne peut pas altérer une partie de l'urobiline ou de la stercobiline que l'on veut extraire.*

Rien en effet dans notre procédé ne peut détruire, ne fût-ce même que des traces d'urobiline. En effet aucune réaction chimique ne se produit dans le mélange, en dehors de l'oxydation du chromogène. En particulier pas d'ébullition, comme dans un si grand nombre de procédés, et l'on sait l'action néfaste de la chaleur sur l'urobiline; pas d'acides forts, pas d'alcool éthylique qui peuvent modifier et transformer l'urobiline, etc., etc.

2. — *Détermination de la teneur en urobiline ou stercobiline des urines ou des fèces examinées.*

Après avoir ainsi extrait de l'urine ou des fèces à examiner l'urobiline et la stercobiline, on obtient en définitive une solution d'alcool amylique, renfermant toute l'urobiline ou toute la stercobiline qu'il va s'agir de doser.

L'appareil de dosage est placé en bonne lumière sur une table qui le met à portée de l'expérimentateur.

Pour faciliter les manipulations la burette graduée est placée en dehors de la cuve à glace, le couvercle de la chambre noire étant relevé.

On procède d'abord au lavage à l'alcool et de la burette graduée et des cuves à glace.

L'alcool amylique chargé de l'urobiline ou de la stercobiline de l'urine ou des fèces dont on veut effectuer le dosage, est versé à l'aide de portion terminale évasée en entonnoir, à l'intérieur de la burette graduée. On a soin de laisser perdre les premiers centimètres cubes ainsi introduits, de façon à entraîner les dernières traces d'alcool de lavage que cette burette pourrait encore con-

tenir. Fermant le robinet, on remplit la burette de telle sorte, que le niveau du liquide atteigne la partie supérieure de cette burette, dépassant de beaucoup la division initiale O.

On fait alors échapper ce trop plein en ouvrant le robinetet on amène le ménisque supérieur du liquide en regard de la division O. L'évacuation de ce trop-plein a pour but de chasser les bulles d'air qui, s'accumulant au niveau et au-dessous du robinet, fausseraient la précision du dosage.

On attend quelques minutes et on s'aperçoit bientôt que le ménisque supérieur du liquide est remonté au-dessus du O. Cela tient au faible calibre de la burette : le niveau du liquide a son intérieur a varié du fait de traces de ce liquide restées sur les parois et lentement descendues.

On ramène soigneusement ce ménisque en face de la division O.

On essuie l'extrémité inférieure de la burette avec un feuille de papier buvard, afin d'enlever les dernières traces de la solution anylique qui auraient pu y demeurer.

Aspirant deux fois de suite, à l'aide d'une pipette graduée, 10centimètres cubes de réactif au valérianate de zinc, on les verse successivement dans les deux cuves à glace, on rabat alors le couvercle de la chambre noire, et l'on adapte à l'aide d'un raccord de caoutchouc, l'extrémité inférieure de la burette sur l'embout en verre, qui descend à l'intérieur de la cuve à glace la plus rapprochée de l'appareil d'éclairage. Un deuxième tube de verre, destiné à agiter le contenu de la cuve à glace y pénètre également.

On allume l'arc électrique, on le règle, et regardant

par le viseur, le regard visuel de l'observateur tombe perpendiculairement sur les deux cuves à glace. Les 10 centimètres cubes de réactif révélateur qu'elles renferment sont éclairés latéralement par un cylindre lumineux brillant *d'une blancheur éclatante.*

On peut à ce moment commencer le dosage proprement dit. Pour cela on ouvre le robinet de la burette graduée, et on fait tomber une goutte de la solution amylique à doser dans les 10 centimètres cubes de réactif valérianique ; on agite par insufflation, on regarde par le viseur et dans l'immense majorité des cas, on voit toujours la blancheur éclatante du cylindre lumineux, éclairant les deux cuves. On continue à verser goutte à goutte la solution amylique, agitant toujours le mélange et surveillant toujours, à l'aide du viseur, le cylindre lumineux.

Bientôt, dans la cuve de gauche dans laquelle tombe le liquide à doser, un trouble apparaît, trouble d'abord léger, puis plus accusé, tandis que se dessine parallèlement une fluorescence qui progressivement s'accuse et se précise.

On voit donc au total dans le cylindre lumineux une *fluorescence verte mais trouble*, et cela dans la cuve placée à la gauche de l'observateur. Dans la cuve placée à sa droite le cylindre lumineux demeure naturellement d'une blancheur éclatante, puisque cette cuve ne sert pas au dosage. Elle est placée là, nous le rappelons, pour servir de terme de comparaison ; grâce à elle, dont la couleur et l'aspect ne varient pas, l'observateur apprécie d'autant mieux les variations de couleur et d'aspect de la cuve voisine. Le dosage est presque terminé et il suffit en général d'ajouter une seule goutte de la solution à doser pour voir immédiatement le cylindre lumineux *fluorescent vert* et *trouble* de la cuve de gauche, se changer brusquement en une

fluorescence verte mais *claire* (1). *La fluorescence-limite est atteinte : le dosage est terminé.*

A ce moment il n'y a plus qu'à lire sur la burette graduée le nombre de divisions, c'est-à-dire de centièmes de centimètres cubes qu'il a été nécessaire de faire tomber dans les 10 centimètres cubes de réactif valérianique pour obtenir cette fluorescence-limite. On note soigneusement ce chiffre.

Remarque. — Dans quelques cas rares, il peut se faire qu'une solution amylique, très riche en urobiline ou en stercobiline, fasse apparaître et au delà, la fluorescence-limite dans le réactif valérianique, avec une seule goutte. La marche à suivre dans ces cas est très simple : il suffit d'étendre la solution amylique primitive de deux ou trois fois son volume, en se servant naturellement pour cette solution d'alcool amylique et de recommencer ensuite le dosage. On notera bien entendu le titre de la dilution, afin d'en tenir compte dans les calculs.

3. — Calculs.

1° *Calculs pour le dosage de l'urobiline.*

Soit U centimètres cubes d'urine examinée.

On dissout toute l'urobiline contenue dans ces U centimètres cubes par A centimètres cubes d'alcool amylique.

N. centièmes de centimètres cubes de cet alcool amylique = la fluorescence — limite.

(1) L'appréciation du passage de la fluorescence trouble, à la fluorescence claire sans être délicate, demande cependant une certaine habitude. C'est pour cette raison que nous cherchons à remplacer la cuve-témoin par un *verre-étalon* coloré, de façon à représenter exactement la teinte à atteindre pour que le dosage soit déterminé ; nous n'avons pu encore solutionner la question.

Or nous savons que ces N centièmes de centimètres cubes, variables avec chaque urine examinée, contiennent invariablement 0,000010 gramme d'urobiline, taux nécessaire et suffisant pour produire la fluorescence-limite.

$$1 \text{ centième de cent. cube} = \frac{0{,}000010}{N} \text{ gr. d'urobiline}$$

$$1 \text{ centimètre cube} = \frac{0{,}0010}{N} \text{ gram. d'urobiline.}$$

A. centimètres cubes contenant donc :

$$\frac{0{,}0\ 010}{N} \times A \text{ gr. d'urobiline}$$

Mais nous savons que ces A centimètres cubes contiennent toute l'urobiline des U centimètres cubes d'urine examinée.

Par conséquent 1 centimètre cube d'urine contient :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{A}{U} \text{ gramme d'urobiline}$$

Si bien que si nous appelons V le volume total des urines des 24 heures la formule générale :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{A}{U} \times V$$

Donne la quantité en grammes ou fraction de gramme de l'urobiline éliminée dans les 24 heures.

2° *Calculs pour le dosage de la Stercobiline.*

Soit 1 gramme de matières fécales desséchées.

A le nombre de centimètres cubes d'alcool amylique en ayant repris toute la stercobiline.

N le nombre de centième de centimètre cube de cette solution nécessaire pour produire la fluorescence-limite.

La formule : $\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{A}{I}$

donnera en grammes ou fraction de gramme la quantité de stercobiline contenue dans un gramme de fèces examinées.

Si bien que si nous appelons P le nombre de grammes de matières fécales deshydratées éliminées dans les 24 heures, la formule générale :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{A}{I} \times P$$

donne en grammes ou fraction de gramme la quantité totale de stercobiline éliminée en 24 heures.

3° *Etablissement d'une constante K.*

Il suit de ces calculs que si l'on se place toujours dans les mêmes conditions, il est possible d'établir une constante qui simplifiera les calculs.

1° *Constante pour l'urobiline.*

Si A = 50 centimètres cubes d'alcool amylique.
Si U = 100 centimètres cubes d'urine.

On peut écrire :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{50}{100} \times V \text{ (volume des 24 heures)}$$

Ce qui revient à dire que pour avoir la quantité d'urobiline, contenue dans 1 centimètre cube d'urine il n'y a qu'à diviser 0,0010 par 2 fois le nombre trouvé de centième de centimètre cube.

Soit $\frac{0{,}0010}{2\ N.}$

soit en définitive $\frac{0{,}0005}{N}$

et pour les V. centimètres cubes des 24 heures.

$$K = \frac{0{,}0005}{N} \times V. \quad \text{grammes ou fraction de gramme d'urobiline.}$$

2° *Constante pour la Stercobiline.*

Si A = 50 centimètres cubes d'alcool amylique.

Si I = 1 gramme de fèces.

Si P est la quantité totale en grammes des fécès desséchées des 24 heures.

Nous pourrons écrire :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{50}{I} \times P$$

Ce qui donne pour les P grammes de fèces en 24 heures :

$$K = \frac{0{,}05}{N} \times P$$ grammes ou fraction de gramme de stercobiline.

CONCLUSIONS

I. Hydrobilirubine, urobiline, stercobiline, sont les noms différents d'une seule et même substance : le pigment découvert par Jaffé en 1868.

II. Les nombreux procédés de dosage de l'hydrobilirubine qui ont été décrits sont, à des titres divers, tous insuffisants et aucun d'eux n'est capable de conduire à des résultats exacts.

III. Devant l'insuffisance des méthodes existantes, nous avons imaginé un procédé clinique de dosage de l'urobiline et de la stercobiline, fondé sur une propriété caractéristique de l'hydrobilirubine : la fluorescence verte, révélée par un réactif spécial à base de valérianate de zinc en dissolution dans de l'alcool à 60° et observée, non pas à la lumière du jour, mais à la lumière artificielle, à l'aide d'un dispositif spécial d'éclairage latéral à intensité lumineuse, électrique, fixe, d'une sensibilité très délicate.

IV. L'appareil proprement dit de dosage ou hydrobilirubinomètre se compose essentiellement d'une burette graduée en centièmes de centimètre cube, d'une chambre noire munie d'un viseur et de deux cuves à glaces, cette chambre noire venant s'adapter directement sur le dispositif d'éclairage artificiel.

V. La base de notre dosage repose sur une solution titrée d'hydrobilirubine que nous dénommons solution-étalon. Notre désir eut été d'employer pour sa confection une substance chimiquement pure, une hydrobilirubine cristallisée. Malheureusement un tel produit n'existe pas et n'a pu jamais être obtenu pratiquement.

Nous avons dû nous résoudre à utiliser une hydrobilirubine relativement pure, mais rachetant son imperfection d'une part par sa méthode de fabrication bien déterminée et d'autre part par son titre invariable ; nous estimons que le produit connu sous le nom d'urobiline de Merck, préparée d'après le procédé d'Hoppe-Seyler répond à ces desiderata.

Cette solution-étalon a été préparée en faisant dissoudre un centigramme de ce produit dans 100 centimètres cubes d'alcool amylique.

VI. Cette solution-étalon, a servi à déterminer, à l'aide de la burette graduée, la *fluorescence-limite*, c'est-à-dire la quantité invariable d'hydrobilirubine capable de produire dans 10 centimètres cubes de réactif révélateur, une *fluorescence verte* mais *claire*, succédant brusquement à une fluorescence antérieure verte mais *trouble*.

Cette détermination nous a donné le chiffre de 0,000010 de gramme d'hydrobilirubine. C'est-à-dire que toutes les fois que la fluorescence apparaîtra dans les 10 centimètres cubes de réactif révélateur, on pourra conclure que l'on se trouve en présence de 0,000010 de gramme d'hydrobilirubine, exprimée en urobiline de Merck et préparée d'après le procédé d'Hoppe-Seyler.

VII. Le dosage d'urines ou de fèces données comporte deux temps principaux : l'extraction de l'hydrobilirubine et son dosage proprement dit.

A. *Extraction.* — L'extraction de toute l'urobiline ou de toute la stercobiline d'un volume connu d'urine ou d'un poids connu de fèces déshydratées est basée sur la précipitation du pigment par le sulfate d'ammoniaque, en milieu légèrement acide, sur l'oxydation de l'urobilinogène et du stercobilinogène par la liqueur iodo-iodurée de Gram et

sur la reprise de l'hydrobilirubine ainsi précipitée par un volume déterminé d'alcool amylique.

Ce procédé d'extraction permet en outre de doser séparement, d'une part l'urobiline et la stercobiline, et d'autre part leurs chromogènes.

B. *Dosage proprement dit.* — Il s'effectue à l'aide de l'appareil spécial ou hydrobilirubinomètre en faisant apparaître la fluorescence verte et claire ou fluorescence-limite dans 10 centimètres cubes de réactif révélateur. Sachant que la fluorescence-limite apparaît toujours avec une quantité d'hydrobilirubine invariablement égale à 0,000010 de gramme, une formule générale permettra de trouver facilement la teneur en urobiline ou stercobiline de l'urine ou des fèces examinées.

1° Formule applicable à l'urine :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{A}{U} \times V \text{ gramme d'urobiline}$$

U égalant le nombre de centimètres cubes d'urine employée.

A égalant le nombre de centimètres cubes d'alcool amylique ayant repris toute l'urobiline des U centimètres cubes d'urine.

N égalant le nombre de centièmes de centimètre cube de cet alcool amylique qu'il a été nécessaire d'employer pour faire apparaître la fluorescence-limite.

V égalant le volume total des urines des 24 heures.

2° Formule applicable aux fèces :

$$\frac{0{,}0010}{N} \times \frac{A}{1} \times P \text{ gramme de stercobiline}$$

1 égalant 1 gramme de matières fécales déshydratées.

A égalant le nombre de centimètres cubes d'alcool amylique ayant repris toute la stercobiline de fèces.

N égalant le nombre de centièmes de centimètre cube de cet alcool amylique nécessaires pour faire apparaître la fluorescence-limite.

P égalant le poids total des fèces deshydratées des 24 heures.

Il suit de l'ensemble de ces calculs, que, si l'on se place toujours dans les mêmes conditions, il est facile d'établir une constante qui simplifiera les opérations.

1° *Constante pour l'urobiline.*

Si A égale toujours 50 cent. cubes d'alcool amylique,
Si U » 100 » d'urines,
Si V est le volume total des urines des 24 heures,
on pourra écrire en définitive après simplifications successives :

$$K = \frac{0{,}0005}{N} \times V \text{ grammes ou fraction de grammes d'urobiline}$$

2° *Constante par la stercobiline.*

Si A égale toujours 50 cent. cubes d'alcool amylique,
Si 1 » 1 gramme de fèces,
Si P est la quantité totale en grammes des fèces des 24 heures,
on pourra écrire en définitive et après simplifications successives :

$$K = \frac{0{,}05}{N} \times P \text{ grammes ou fraction de grammes de stercobiline}$$

Il est et reste bien entendu que les chiffres ainsi obtenus ont surtout, du fait de la qualité relative de l'hydrobilirubine employée pour la confection de la solution-étalon et la détermination de la fluorescence-limite, la valeur de *rapports,* et qu'ils ne sauraient prétendre à exprimer exactement en poids des résultats absolus.

BIBLIOGRAPHIE

Abel. — Bemerkung über die tierisch Mélanin und das Nemosiderin. *Virchows' Arch.*, 1890.

Abelous et Gérard (E.). — *Acad. des Scien* , CXXXIX, pp. 56, 191 et 1023 ; t. CXXX, p. 420.

Achard et Castaigne. — L'examen clinique des fonctions rénales.

Achard et Morfaux. — Urobilinurie et perméabilité rénale. *Soc. de biol.*, 28 janv. 1899

— *Gaz. hebd.*, 2 fév. 1899.

Ajello. — Contribution expérimentale à la genèse de l'urobiline dans les liquides kystiques et dans les exsudats. *Il Morgagni*, déc. 1893, p. 722.

Ajello et Solaro. — Variations de quelques-uns des principes de l'urine dans la cirrhose du foie sous l'influence de l'alimentation. *Il Morgagni*, pp. 1 et 65, janv. et fév. 1893.

Ameuille. — *Les pigments pathologiques*, *Revue générale in Biologie Médicale*, mai 1910, p. 133.

Arnould. — Urobilinurie paroxystique. *Ann. des maladies génito-urinaires*, 1891, p. 100.

Arthus. — *Précis de chimie physiologique.*

Auché. — Sur un détail du spectre de l'urobiline, *Soc. de biol. de Bordeaux*, 3 déc., 1907, n° 37, p. 711.

— Sur une nouvelle méthode pour rechercher et séparer l'urobiline et son chromogène. *Soc. de biol. de Bordeaux*, 3 déc. 1907, p. 713.

Auché. — Recherche simultanée de l'urobiline, de son chromogène et des pigments biliaires vrais. *Soc. de biol. de Bordeaux*, 22 déc. 1908, p. 757.

Auché (A.). — Séparation de l'urobiline de la bile. *Soc. de biol. de Bordeaux*, 22 déc. 1908, p. 759.

Auché. — Recherche de l'urobiline de la bile. *Gaz. heb. des S. M. de Bordeaux*, n° 1, 5 janv. 1909.

Auché (A.). — Sur une méthode de préparation de l'urobiline pure. *Soc. de biol. de Bordeaux*, 6 juill. 1909, n° 26, p. 227.

Auché (A.). — Sur une méthode de dosage de l'urobiline. *Soc. de biol. de Bordeaux*, 6 juill. 1909, et *Gaz. hebd. des Sciences méd. de Bordeaux*, n° 28, 1909, p. 328.

Auscher et Lepique. — Arch. phy., 1891, arch. phys., 1896. *Soc. de biol.*, 12 fév. 1898.

Ausset. — L'importance de l'examen méthodique des selles chez les enfants. *Pédiatrie pratique*, Lille, 1905, p. 121-124. 22 déc. 1908, p. 757.

Bar. — *Soc. méd. des hôp.*, 22 mars 1900.

— *Soc. d'obstétrique de Paris*, 1903, VI, p. 149-152.

Bar et Daunay. — *Soc. d'obst.*, 1903.

Bard. — *Soc. de biol.*, 28 nov. 1903.

Bargellini. — Sui rapport della urobilinaria cable condizione del tubo intestinale. *Lo Sperimentale*, 1892, p. 119.

Beck. — Formation de l'urobiline. *Wiener klin*, 29 août 1895.

Beaunis. — *Physiologie*, 1888.

Bert (Paul). — Matières fécales (in *Dictionnaire Jaccoud* 1869).

Bertrag. — *Wienner Med. Wis.*, n° 52, 1891.

Berzélius. — *Traité de chimie*. Trad. franç., tome VII.

Binet. — Sur les variations de quelques pigments urinaires. *Revue médicale de la Suisse Romande*, 1894, p. 231.

Bogomoloff. — *Centralbl. f. d. med. Viss.*, bd. XIII.

Bogomoloff. — Die methoden der quantitativen Bestimmung des Urobilines im Harn. *Deutsche med. Woch.*, 1892, n° 43 et *Jahresbericht. f. Thier. chemie*, vol. XXII, 1893.

Bogomoloff et Koschlakoff — Unterschied Zwischen der Pettenkoffu Gallensauren und Eiweiss reaction. *Centralbl. de f. mediz Wissenschaft.*, p. 520 et 1869, p. 529.

Boix. — Etudes clinique des ictères. *In Manuel de Med. Debove et Achard*, t, VI.

Borrieu. — Sur l'hydrobilirubine fécale. *Soc. de biol.*, p. 658, 16 avr. 1910.

Bouchard. — Leçons sur les auto-intoxications. 1887, p. 241.

Brezina. — Sur la spécificité des fèces, différenciation de différentes sortes de fèces par la voie biologique. *Wiener. klin. Wochensch.*, n° 19, 9 mai 1907.

Breznia et Ranzi. — Sur l'examen biologique des fèces. *Wiener. klin. Wochensch.*, n° 44, 29 oct. 1908.

Brissaud et Bauer. — Recherches expérimentales sur les relations entre l'élimination des pigments biliaires de l'urobiline et de l'urobilinogène chez le lapin. *Soc. de biol.*, 9 mai 1908, p. 809.

Bunge. — *Chemie. Leipzig*, 1898.

Carlo-Merletti. — *Rivisto Venetia di kl. Medic.*, 1904.

— Contributo sperimentale allo studio della genese della urobilinura. Acad. flor., 12. 1. 1897.

Castaigne et Chiray. — In *Manuel de Médecine* Debove, Achard. Maladies du foie, 1910, p. 27.

Caussade. — *Néphrite pneumonique.* Thèse Paris, 1899.

Cawadias. — L'examen fonctionnel de l'intestin par l'étude des fèces. *Rev. génér. in Progrès médical*, n° 21, p. 283-290.

Chabrié. — Sur un cas d'hémoglobinurie paroxystique a frigore. *Ann. mal. org. genit.-urin.*, avr. 1891.

Chassevant. — Urobiline et urobilinurie. *Presse médic.*, 26 juin 1896, p. 52.

Chauffard. — Maladie du foie, in traité de Médecine Charcot, Bouchard et Brissaud. Tomes III et V.

— Séméiologie du foie, in *traité de Pathologie générale* de Bouchard. Tome V.

Chauffard. — *Soc. méd. des hôpitaux*, mai 1903.

Chauffard et Rendu. — L'urobiline fécale et sa valeur clinique. *Presse médicale*, 28 août 1907, p. 545.

Clarens. — Etude critique des différentes théories sur l'origine de l'urobiline. Thèse de Toulouse, 1903.

Cothen. — Chemie. Rec. Zeitung, 7 mars, XXIV, 79.

Dastre. — Article bile in Dictionnaire de Physiologie de Richet. Tome II, fas. I.

Dastre et Floresco. — Recherches sur les matières colorantes du foie et de la bile et sur le fer hépatique. Paris 1899.

Debary. — Indicanurie. Urobilinurie. Thèse de Lille, 1898.

Debove. — Discussion sur le traitement de la tuberculose. Soc. méd. des hôp., 14 et 21 fév. 1896.

Denigès. — Recherches sur l'urobiline. *Soc. de biol.*, 20 mars 1897.

Deroide. — Sur la présence de l'urobiline dans l'urine. *Echo méd. du Nord*, 16 janv. 1898.

— Recherche de l'urobiline dans les urines. *Soc. de biol.*, 12 mars 1898.

Deyeux. — Considération sur le sang des ictériques. Thèse, an XII, p. 3.

Disqué. — Stercobiline. Zeitschr. fur, phy. chemic., II, 259.

Disqué. — Sur l'urobiline. Zeitschrift. f. physiol. chimic., bd. II, p. 259, 1878.

Dor. — L'urobiline des gastéropodes. *Soc. de biol.*, 1902, p. 54.

Doyon, Gautier et Policard. — Action du chloroforme sur l'excrétion de l'urobiline. *Soc. de biol.*, 5 déc. 1908.

Dreyfus-Brisac. — L'ictère hémaphéique. Thèse de Paris, 1878.

Durand. — L'urobiline. *Progrès médical*, n° 4, 20 janv. 1910, p. 44.

Engel et Moitessier. — *Traité élémentaire de Chimie biol. pathol. et clinique*, Paris, 1897.

Esser. — Untersuchungen über die Entstehungsweise des Hydrobilirubins in Menschen Korper, Diss. Bonn., 1896.

Esoffe. — *Pflügers arch.*, t. XII, 1876, p. 50.

Fischler. — Das Urobiline und seine klinische Bedentung. *München med. Wochens.*, 1906, t. LIII, 1784.

Flischer. — *Medecin Viesbaden*, J. F. Bergmann, 1896, S. 1161,

Florence.— *Journ. de phy. et de Ch.*, 1908, série 6, XXVII, p. 145.

Foumouze. — *Les spectres d'absorption du sang*, Thèse de Paris, 1871.

Fourcroy. — Bile in *La médecine éclairée par les scienccs physiques*, 1792, tome III, p. 105.

Frémy. — *Encyclopédie chimique*, t. IX.

— Chimie des liquides et des tissus de l'organisme, 2e partie VI. par le Dr Garnier, 1896. Dunod et Vicq, Paris.

Frerichs. — *Klinik der Leberkrankheiten*, Brunschwig, 1858 ou trad. franç., 1866, p. 102.

Froin. — *Gaz. des hôp.*, 5 et 12 nov. 1903.

Garrod et Hopkins. — De l'urobiline, unité de l'urobiline. *J. of. phy.*, XX, 1896, p. 112.

— *J. of. phy.*, XXII, n° 6, 1898.

Garrod (Archibald). — *Journal of physiology*, mars 1897, p. 190.

Gaultier (René). — Exploration fonctionnelle de l'intestin par l'analyse des fèces. Th. Paris, 1905.

— *Précis de coprologie clinique*, 1907.

Gautier. — Chimie appliquée à la physiologie, à la pathologie et à l'hygiène, t. II, 1874.

— Traité de chimie, t. III, Paris, 1892, p. 620-639.

— La chimie de la cellule vivante.

— *Leçons de chimie*. Paris 1897.

Gautier et **Monod**. — Procédé de recherche des corps du groupe de l'urobiline dans l'urine humaine. *Soc. de biol.*, 6 fév. 1909, p. 211.

Gautier et **Russo**. — L'excrétion normale des corps du groupe urobiline. Leur présence dans l'urine du lapin. *Soc. de biol.*, 19 juin 1908, n° 21, p. 1026.

— *Soc. de biol.*, 13 janv. 1909.

Gautrelet. — *Essais de spectroscopie urologique*, n° 1, etc., 1897.

Gautrelet. — Technologie de l'urobiline. Revue des maladies de la nutrition, fév. 1896.

— *Soc. de biol.*, 16 mai 1903.

Gérard. — Académie des sciences, t. CXXXII, p. 153.

— *Soc. de biol.*, 26 janv., 1901.

— Acad. des Sciences, 26 mai 1902.

Gerhardt. — De l'urobiline. Zeit. f. Klin. med., XXXII, 1897, p. 303.

— Hydrobilirubine et ictère. Inaug.-dissert. Berlin. 1890.

Giarré. — Pathogénie de l'urobilinurie (Lo Sperimentale), 4 p. 51.

— Genèse de l'urobiline. *Acad. med.*, Fis Florendino, 14 janvier 1897.

Giarré. — Genèse de l'urobiline. Riforma med., 1er fév. 1897.

— Pathogénie de l'urobiline. Acad. med., fis Florentino, 12 fév. 1896.

A. B. Gianasso. — L'urobilinurie dans la chloronarcose. *Riforma med.*, n° 20, 19 mai 1906.

Gilbert. — Séméiologie du sang.

— In traité Path. génér., Bouchard, t. IV.

— In traité Méd., Charcot-Bouchard, Brissaud.

Gilbert et **Carnot**. — *Les fonctions hépatiques*. Paris, 1902.

Gilbert et **Castaigne**. — *Soc. de biol.*, 15 avril 1899, 29 avril 1899, 29 juil., 1899.

Gilbert et **Fournier**. — Maladies du foie, in traité de Méd. et de Thérap., Brouardel et Gilbert, t. V.

Gilbert et **Herscher**. — Stercobiline physiologique. Soc. de biolog., 16 nov. 1907.

— Stercobiline pathologique. Soc. de biol., 7 déc. 1907.

— Sur la formation de la stercobiline dans l'intestin. *Soc. de biol.*, 28 déc. 1907.

Gilbert et **Herscher**. — Cholémie physiologique. *Presse Méd.*, 31 mars 1906, p. 201.

Gilbert et **Herscher**. — De la stercobiline. *Presse Méd.*, 26 août 1908.

Gilbert et **Herscher**. — Sur la diminution de coloration du sérum sanguin. Soc. de biol., 23 nov. 1901.

— L'ictère hémaphéïque, in Presse Méd., n° 104, 27 déc. 1902.

— Les ictères acholuriques, in Presse Méd., n° 60, 29 juil. 1903.

— Origine rénale de l'urobiline. Soc. de biol., 28 juin 1902.

— L'urobilinurie, *in Presse Méd.*, n° 71, 3 sept. 1902.

Gilbert et **Lereboullet**. — La cholémie simple familiale. *Sem. Méd.*, 24 juil. 1901.

Giovanni Marini. — Rivista critica de *Chemica Medica*, n° 2, 1904.

Gley. — Remarques sur les recherches de Viglesio sur la pathogénie de l'urobilinurie. *Arch. de physiol.*, IV, 1, 1892.

Gorodecki. — Ueber der influess du experimentall in der Körper eingeführten Hemoglobine auf secrétion unt Ludammensetzung der Galle. *Inungural disert.*, Dorpat, 1889.

Gorup Bezanez. — Traduction Schlagdenhauffen. *Traité de chimie biologique*. Paris 1880.

Grigaut. — Recherche de l'urobiline dans le sang et les humeurs de l'organisme. *Soc. de biol.*, mai 1909, p. 725.

Grimm. — Sur l'urobiline dans l'urine. Arch. f. path. anat., CXXXII, p. 2.

— *Wirchow's Arch.*, Bd. CXXXVI, p. 246.

Grimbert. — *Journal de Pharmacie et chimie*, 1888 et cours à l'école de pharmacie.

Guiart et **Grimbert**. — *Article Urobiline*, in Précis de diagnostic clinique microscopique et parasitologique, p. 757.

Guignes. — Quelques observations sur la recherche de l'urobiline dans les urines. *Bulletin des sciences pharmacologiques*, n° 2, 1909, p. 86.

Guistianini. — *Trattato de Chim. applicata*, III, p. 29.
Gübler. — *C. R. de la Soc. Méd.*, 1857, p. 428.
Hall. — The estimation of fat in fœces. *British. med. Journ.*, 1907, 1907. p. 1399.
Hammarsten. — Ein Beitrag zur Kentniss der Menschengalle in Jahresber. f. Thierchemie, 1878, t. VIII, p. 263.
— Ueber das Vorkommen von Gallen farbstoff in dem Blutserum in Maly's Jahresbericht, 1878, t. VIII, p. 129.
Hammarsten. — Lehrbuch der physiol., *Chemic Wiesbaden*, 1889, p. 507.
Hanot. — Note pour servir à l'histoire de l'acholie. Soc. de biol., 30 mai 1884.
— Note pour servir à l'histoire de l'acholie pigmentaire, 26 jan. 1884.
— *Ibid. Arch. de Méd.*, janv. 1885.
— Cirrhose pigmentaire. Soc. de biol., 13 mars, 17 juin 1893.
Hanot. — La bile incolore. Acholie pigmentaire *Sem. méd.* 1895, p. 197.
— *Sem. med. des hôpitaux* 14 et 21 fév. 1896.
Hanot et Schacman. — *Arch. de Phys.* 1886 et 1887.
G. Harley. — Traité des maladies du foie. *Trad. Rodet*, 1890.
— Formation de l'urobiline. *Brit. med. Journ.* 3 oct. 1896, p. 898.
Harris. — Hématoporphyrine. Ses rapports avec l'origine de l'urobiline. *J. of anatomy*, avril 1897.
Hayem. — Congrès de Grenoble 1885.
— Recherches cliniques sur l'urobiline. *Soc. méd des hôp.* 22 juill. 1887.
— Considération sur la valeur diagnostique et pronostique de l'urobiline. *Soc. méd. des hôp.* 13 déc. 1889.
— *Soc. med. des hôp.* 14 et 21 fév. 1896.
— Leçons sur les maladies du sang. Paris 1900.
Hedenius. — Methode zum Nachweise der Gallenfarbstoffe in ikherischen Flussigkeiten in (Upsala Läkare förenings 29; 541) Molys'Jahasb. 1894, p. 385.
Hénocque. — Soc. de biol. 29 oct. et 5 nov. 1892.
— Archives de Phys. 1892, I V I.
— Analyse spectroscopique du sang par l'examen direct des tissus. Association française. Congrès de Besançon 1893.

— Spectroscopie biol. IV. Paris.
— *Hématospectroscope. Analyseur chromatique. Ophtalmo-spectroscope.*
Herscher. — Origine rénale de l'urobiline. Thèse de Paris 1902.
— Etude physico-chimique de l'ictère. Origine rénale de l'urobiline urinaire et de la stercobiline : in Les maladies du foie et leur traitement. Paris 1910.
Hewes et Adler. — L'examen des fèces pour l'étude de l'état fonctionnel du tube digestif en clinique. *Boston, med and. surg. Journ.* 1909, p. 429.
Hildebrandt. — La question de l'eurobiline. *Deutsche Mediz.* Wochensc, n° 12, 19 mars 1908.
Hildebrandt. — Sur l'origine et la signification de l'urobiline. *Münchener medizinische Wochenschrift*, n° 14, 6 avril 1909, n° 15, 13 avril 1909.
Hildebrandt.— Sur la question de l'origine de l'urobiline. *Deutsche Med.* W. n° 50, 10 déc. 1908.
Historical. — Retrospect ou earlier and critical consideration of contemporaneons researches ou bihary pigment *sin Ann. Chem. Med.* London 1879, p. 315.
Hoppe-Seyler. — Analyse qualitative et quantitative des fèces. Encyclopédie clinique Fremy, p. 256-263.
— Berl. chem. Ber. 1894, p. 1066.
— Arch. f. d. gesam, physiol. t. X, p. 208.
— Ictère urobilinique Wirchows and. 1891, p. 30.
— Chimie appliquée, trad. Schagdenhaufen 1897.
— Stercobiline provenant de l'hématine. *Phys. Chimie*, p. 339 et 344. Edit. 1878.
Huber. — Ueber die Ursache und die Bedentung des Urobilinurie. *Charite annales*, Berlin 1906, p. 52.
Ida. — Urobilinurie dans l'enfance. *Lo spérimentale*, 1889.
Jaffé. — Urobiline. Beitrag zur Kenntniss de Gallen und Harnpigment *Centralbl. f. d. med.* Wiss., 1868, p. 243, *ibid.*, 1871, p. 465.
— *Arch. für path. Anat.*, bd XLVII. Heft. III et IV, 1868.
— *Arch. f. d. gesam. phys.*
— *Wirchow's arch.*, bd. I, 1869, t. XLVII.
— *Centralbl. f. der med. Wissem*, 1889.
— *Jahresb. f. Thier. Chem.*, t. I, p. 33.

Janert. — *Ueber das specifische gewicht menschlicher fœces.* Berlin 1906.

Jolles. — Recherche de l'urobiline dans les urines. *Arch. f. ges. phys.* LXI, p. 11, 1895.

— Présence et recherche de l'urobiline dans l'urine normale et pathologique. *Centralbl. f. inn med.*, 48, 1895.

Jones. — Examination of the fœces *Thérap. Gaz.*, 1907, p. 318-322 et *North. Westh. med. Seattle*, 1909, p. 48.

Juillet. — *Contribution à l'étude des selles blanches chez le nourrisson.* Thèse de Paris, 1905.

Katz. — Signification clinique de l'urobilinurie. *Wiener med. Woch.*, 11 juillet 1891, *ibidem*, 1899.

Kast et Mester. — *Zeits. f. kl. med.* Bd. XVIII, p. 469.

Kaufmann. — Ueber den diagnostichen werth der Kothuntersuchung. *Med-Monatschrift*, 1895, p. 387.

Kiener et Engel. — Ictère et urobilinurie. *Gaz. heb. des Sciences méd. de Montpellier*, n° 34, 1837.

— Conditions pathogéniques de l'ictère et de ses rapports avec l'urobilinurie. *Arc. de phy. norm. et pathol.*, t. 88, n° 6, p. 198, 1887.

— *Soc. de biol.*, 6 oct. 1888.

Kolbé. — L'a b c de l'examen fonctionnel de l'intestin dans la pratique journalière. *Presse médicale*, 11 août 1909.

— Examen fonctionnel de l'intestin. *Arc. des mal. de l'aff. digestif, et de la nutrition*, mars-avril, 1909.

Kolisch. — *Club médical de Vienne*, 3 nov. 1897.

Kratkow. — Ueber der Einfluss der unterbindung der Gallengavges auf den stoffwechsel im thierschem organismus. *Wratsch*, 1891, n° 29 et *Centralbl. Wissench*, 1891, n° 51, p. 92.

Krehl. — *Pathologische physiologie*, Leipzig, 1898.

Krokiewicz i Batko. — Nowy odzcinnik na barwiki zölaowe, w. morzu, *in Przeglad le Karski.* Krakow, 1898, p. 65.

Krukenberg. — *Mayl's-Jahresbec*, 1885, p. 139.

— Pigments. Heidelberg, 1884.

Küffrath. — Ueber die abwesenheit der Gallensamen im Blertts nach dens Verschluss der Gallen und der Milehbrustganges. *Arch. de phys.* de Brown-Sequard, 1880, p. 92.

Kühne. — *Lehrbuch der physiologischen Chemie.* Leipzig, 1868.

Kunkel. — Ueber das anfreten verschiedenem farbstoffe in harn. *Wirchow's Arch.*, t. LXXIX.

Labbé. — *Urologie de la scarlatine*. Thèse de Paris, 1903.

Labadie-Lagrave. — *Urologie clinique et maladies des reins*. Paris. 1888.

Ladage. — Urobilinurie. *Proefschrift Leiden*, 1889.

Lapicque. — Le foie détruit l'hémoglobine. *Soc. de biol.*, pp. 464, 897.

Lassaigne. — Etude chimique du sang dans l'ictère et considérations sur cette liqueur. *Journ. de Chimie. méd.*, 1825, cahier 6, p. 226.

Lambling. — Fèces. *Dictionnaire de Wurtz*, 2e supplément.

Le Canu, — *Du sang*. Thèse Paris, 1837.

Le Comte. — The examination of the fœces as an aid to diagnosis. *Atlanta Journal Record. méd.*, 1908-1909, p. 250.

Lefèvre. — *Spectroscopie* (Encyclopédie des Alde-Mémoires).

Legrain. — Urobilinurie. *Ann. des maladies des organes génito-urinaires*. Déc. 1891, p. 859.

Lemaire. — *L'urobiline. Sa valeur séméiologique*. Thèse de Paris, 1905.

— La réaction de l'urohématine. *Presse méd.*, 8 oct. 1904.

Lemaire. — De la stercobiline. *Echo médical du Nord*, 10 janvier 1909.

Lenoble. — *Caractères séméiologiques du caillot et du sérum*. Thèse Paris, 1898.

Lereboullet. — *Les cirrhoses biliaires*. Thèse Paris, 1902.

Lesieur, Monod, Morel. — Recherches expérimentales et cliniques sur la signification de l'urobiline. *Soc. de biol.* 29 fév. 1908.

Lesieur et Méret. — Y a-t-il normalement de l'urobiline dans l'urine humaine? *Soc. med. des hôp. de Lyon*, 2 juin 1908. *Presse médicale*, 5 août 1908, p. 501.

Lesné et Ravaut. — Des rapports réciproques de l'hémoglobinurie, de la cholurie et de l'urobilinurie, consécutive à l'hématologie expérimentale. *Soc. de biol.* 14 déc. 1900.

Létienne. — *De la bile à l'état normal et à l'état pathologique*. Thèse de Paris, 1891.

— Recherche des pigments biliaires dans l'urine. *Médecine moderne*, 23 juin 1894.

Letulle. — Cirrhose hypertrophique pigmentaire non diabétique. *Soc. med. des hôp.* 5 février 1897.

Leube. — Contribution à l'étude de l'ictère urobilinique. *Sitzungs Berichte der phys. med. gesellsch.* 2 Wurzburg, 1888.

— Nouvelle substance colorante pathologique de l'urine. *Arch. f. path. anat.* CVI, 2. p. 886.

— Nouvelle matière colorante pathologique de l'urine. *Sitz. Ber. der. phy. med. gesellsch r. Wursburg*, p. 132, 1886.

Lévy-Sirugue. — Examen clinique des selles. *Gaz. des hôp.* 1903, p. 1447.

Liebermann. — *Revue des sciences médicales*, 1876.

Lobligeois. — *Etude clinique et diagnostic des érythèmes scarlatiniformes au cours de la diphtérie.* Thèse de Paris, 1902.

Lonnzka. — *Urobiline et ictère urobilinique*, Inaug. dissert, Wurzburg, 1888.

Lorisch. — Kalorimetrische fœces untersuchung. *Zeitschr. phy. chem.*, 19 mai 1904.

Loyer (P.). — *L'acholie pigmentaire chez les enfants*, Thèse Paris, 1906.

Lynch. — *Etude des fèces normales.* Buenos-Aires, 1905.

Mac Munn.— Origine de l'urohématoporphyrine et de l'urobiline normale et pathologique dans l'organisme. The *Journ. of phys.*, vol. X, p. 71. 1890.

— *Proced of the Royal Society of. London*, 1881, vol. XXXI, p. 206.

— Urohématine. *Iahrb. f. Thier. chimie*, 1881, p. 214, 1885, p. 324.

— Bile pigments and others, the *Journ. of Phys.*, vol. VI, nos 1 et 2.

— *Clinical chemistry of urine*, Churchill London, 1889.

— Stercobiline provenant de la nourriture par hématine, *Journ. of Phys.*, X, p. 115.

— Hématoporphyrine *Journ. of Phys.*, t. XI, p. 13, 1890.

— Animal chromatology. Procedings Birmingham. Philosophical. *Society Quately Journ. of microscopie anat.*, 2 sept. 1895.

Maly. — Unter suchungen ueber die Gallenfarbestoffe. *Ann. de Chemie. et Pharm.*, t. CLXXV, 1874.

— *Ann. Che. et Phar.*, t. CLXI, p. 368, t. CLXIII, p. 77.

— *Centralbl. f. die med. Wissensch*, 1871.

Masius. — *Centralb. f. med. Wossensch*, 1871, n° 25.

— *ibidem*, q. 1871, s. 849.

Mathieu et **Roux**. — *Maladies de l'appareil digestif*, Paris, 1907.
Mayet. — *Traité de Séméiologie*, p. 745.
Méhu. — *L'urine*. Asselin. Paris, 1880.
— *Chimie médicale*, 1870-78.
— *Journ. de phys. et de chimie*, 1878, t. XXVIII.
— Urobiline. *Bull. de l'Acad. de méd.*, p. 26, 1878.
Meillère. — *Tribune médicale*, 4 juillet 1903.
Meinel. — Sur la genèse de l'urobiline. *Centralbl. f. im. med.*, 2 mai 1903.
— Présence de formation de l'urobiline dans l'estomac, *ibidem*, 2 mai 1903.
Mettey. — Thèse de Paris, 1904.
Milian. — *Tribune médicale*, 4 juin 1904,
Moitessier. — *Eléments de physique*, p. 257.
Moller. — La question de la genèse de l'urobiline. *Berlin. Klin. Wochens*, 20 déc. 1909.
Monges (J.). — Origine de l'urobiline fécale, 16 nov. *Soc. de Biologie*, de Marseille 1909.
Monges (J.). — *Valeur seméiologique de la Coprologie*. Thèse de Paris, 1909.
Mongour. — *Semaine médicale*, 16 sept. 1908, p. 456.
— *Congrès de Méd. Int.* Genève, sept., 1908.
O. Monod.— Origine et valeur clinique de l'urobiline. *Archives des Mal. de l'app. digestif et de la nutrition*. N° 5, mai 1909, p. 266-288.
Morel et **Monod**. — Technique très sensible pour rechercher l'urobiline applicable à tout le liquide, même au sérum. *Soc. de Biol.*, 8 fév. 1908, p. 205.
Morfaux. — *Recherches sur l'urobilinurie*. Thèse de Paris, 1899.
Muggia. — *Gaz. méd. de Torino*, n° 41, 1893.
Muler (F.). — Ueber Untersuchungen von Icteres. *Zectsch. f. Klinik med.*, 1887, p. 45.
Müller. — *Virchow's Arch.*, 131, 1893.
— *Zeitschr. f. Biologie*, 20, 1884, S. 327.
Mumford. — Some cases of protracted nonassimilation defert in the biliary pigment in the fœces, but Without jaundice. *Med. chron.* Manchester, 1908, p. 169.
Mya. — Pathogénie de l'urobilinurie. *Congrès méd. int.*, 1890.

— Vomissement urobilinique non fécaloïde dans l'occlusion intestinale. *Rivista. Clinica di Bologna*, p. 609, sept. 1887.

— Physiologie pathologique, de l'ictère. *Arch. med. ital. fslsch.*, 1891.

— Urobilinurie dans l'ictère. *Rivista génér. ital. di clin.*, n° 5, p. 106, 1891.

— Sur la question de l'urobilinurie. *Lo spérimentale*, tome X, p. 71, 1896.

Mya. — L'urobilinuria nell'itterizia. *Giorn della R. Accademia di medicinadi. Torino*, 1891.

Myer. — Examination of the fœces as a routine procedure. *J. Missouri M. Ass.*, St. Louis, 1908, p. 83-90.

De Nabias. — Recherche rapide de l'urobiline dans les selles. *Journ. de méd. de Bordeaux*, n° 51. 23 déc. 1906.

Nepper. — Constipation et sécrétion biliaire. *Gaz. des hôp.* 1908; p. 1516.

Nencki et Sieber. — Unter suchungen über den Blutfarbstoff. *Arch. f. experim. path. und. pharmak.* 1884, t. XVIII, p. 401.

— Ueber das Hœmatoporphyrine. *Arch. f. exp. path. med. pharmak.* Vol. XVIII, p. 405 XX, p. 325, XXII, p. 430.

— *Journal f. prackt. Chemie*, t. XXXV, p. 333, 1882.

— *Bulletin Société chimique*, 3e série, IV, 1895.

Neubauer et Vogel. — Anleitung zur qualitativen und quantitaveu, Analyse des Harnes. Wiesbaden 1898.

Nichols. — Notes on the reactions and tests of bile pigments in urine and other organii fluids in *Med. News*. N. Y, 1896, p. 717.

Nicloux. — Article fèces. *Dict. de physiol.* de Richet.

Nothnagel. — Examination of the fèces. *Northwest Lancet*, 1905, p. 235.

Von Œfele. — Die praktische fœces analyse und ihr laboratorium *Med. bl. Wun.* 1902, p. 317-319.

— Eine einzelne fœces-analyse in rahmen der krankengeschichte besproschen. *Med. bl.* Wien. 1902. p. 212-214.

— Diatetische indicationem, diagnostiche anhalts punkte und therapie nach einer einzelnen fœces-analyse.

— Nachtrœgliche einleitung zu den koprologischen auf sœtzen. *Deutsche med.* Presse, 1904, p. 164.

— Vorschlag zu einer vereinbarung fur systematische kotanalysen *Berl. d. deutsch. pham Gesellsch.* 1904, p. 239-279.

— Ausfuhrliche untusuchung des menschlichen kotes. Leipzig 1904.

— Ausgangs punkte zur praktischen kotanalyse. — *Deutsche med.* 1905, p. 81.

— Technik der chemischen unter suchung des menschlichen kotes, Leipzig 1908.

Oliviero. — *Union pharmac.* 1904.

Parmentier. — Maladies du sang, *Traité de Méd. et de Thérap.* Brouardel et Gilbert, t. VI.

Patella. — De l'ictère. *Congrès de Médecine interne*, 1891.

Patella et **Accorimboni.** — L'urobilinurie dans l'ictère. *Arch. ital. clin. med.*, 1891.

Pellacani. — Pathogénie de l'urobiline. *Gaz. des osp.* Milano, 1885.

Pierracini. — Le *Clinica moderne*, 1901.

Piorrhy et **Lhéritier.** — Cholihémie, ictère, jaunisse, morbus regius, in *Traité des altérations du sang*. Paris 1840.

Planeller. — Analisis quinico y bacteriologio de las heres fécales. *Med. de los ninos*. Barcelona, 1909, p. 53-59.

Poncet. — *L'ictère hématique traumatique.* Thèse de Paris, 1874.

Quincke. — Contribution à l'étude de l'ictère. *Virchow's Arch.* t. XCV.

— Eigenthumlicher Farbestoff in Harn, Sulfonal vergiftung *Berliner klin Wochensch*, 1892, n° 36.

Quincke et **Hoppe Seyler.** — Die Krankheiten der tieber., Wien. 1889.

Rank. — *Munich med. Woch.*, 30 sep. 1902.

Ransom. — Recherches sur la sécrétion de la bile dans un cas de fistule biliaire. *Associat. méd. britann. Congrès de Carlish.*, juil. 1896.

Reale. — Sur l'urobiline, *Rivista clinica e terap.*, n°4, 1891, p. 171.

Retterer. — Article « Pigment » du *Dictionnaire Encyclop. des Sciences médicales.*

Riva. — *Gaz. méd. de Torino*, 1892.

— Ds quelques pigments de l'urine humaine. Milan 1894. *Gazetta medica di Torino*, 1894.

— Pathogénie de l'urobiline. Note critique. *Lo sperimentale*, 1896. *Société de Biologie*, 1905, p. 711-713.

Riva et **Zoja**. — Sulla bilina nelle fece et nelle urine, 1888.

Roberts. — *New-York. State Journ. med.*, 1907, p. 10-14.

Robin. — *Leçons sur les humeurs. Des produits médiats en général, du méconium, du chyme et des fèces en particulier*, XXIX^e^ leçon, p. 943, 2^e^ édition, 1874.

A. Robin. — De l'acholie pigmentaire. *Soc. de biol.*, 1^er^ mars 1884.

Roch. — Du peu de valeur du bleu de méthylène pour la recherche des pigments biliaires dans l'urine. *Bull. général de thérapeut.* n° 19, 23 nov. 1906.

Rolleston. — *Société clin. de Londres*, 12 mars 1897.

Rossi. — *Rivistacritica di clinica medica*, 1903.

Roy. — *Urobilinurie et glycosurie dans l'érysipèle*. Thèse Paris, 1893.

Sabrazes et Lafargue. — *Gaz. hebd. de Bordeaux*, 1903.

Saillet. — De l'urospectrine. *Revue de med.* p. 542, 1896.

— *Bulletin gen de thér.* 15 mai 1894.

— Urobiline dans les urines normales. *Revue de méd.* fév. 1897.

— *Revue médicale de la Suisse romande*, 1897.

Salisbury. — The clinicalvalue of fécal examination. *Med. Debat*, 1905, p. 253.

Salle. — Hématoscopie clinique. *Arch. de med. milit.* sept. 1894.

Salskowsky. — Practicum der physiologischen und pathologischen chemie. Berlin, 1906.

Schmidt. — Ueber Hydrobilirubin-bildung im organismus. *Verhandl des Kongr. f. inn. med.* 1896.

— Fœces untersuchungen in der praxiœ. *Zeitschrift. fur. prakb* 1900, p. 201-205.

— *L'examen fonctionnel de l'intestin*. Traduction Kolbé. Paris, 1909.

Schmidt et Strassburger. — *Dies des menschen*, Berlin, 1900.

— *Ibidem*. Berlin, 1902.

Schmitt. — *Matières colorantes de l'urine normale*, Th. de Paris, 1898.

Schorlemmer. — *Arch. f. Verdaungskr*, 4 1898, s. 151.

— Inaug. dissert. Bonn., 1901.

Silvestrini. — Urobiline pigment jaune et lipochrome, *Clinica moderne*, 21 nov. 1900.

Simon (Franz). — *Medicin Chemik*, t. I, p. 328.

Simonini. — *Revista de clinica pediatrica*, Avril 1904.

Stadelmann. — Der icterus und seme verschiedenen Formen, Stuttgart, 1891.

Strassburger. — Experimentalle klinische untersuchungen über fonctions gœhrung des darmes. *Deutsches Arch. f. klin, med.*, 1908.

Steensma. — Ueber den nachweiss kleiner meugen gallenfarbstoffes in fœces und blut. *Centralblatt. f. phys, m. path.*, 1908, p. 231.

— Ueber die Untersuchung der Fäzes auf urobilin, *Nederl. Tridschr. von Geneeskunde*, 26 janv. 1907.

— Simplification de la méthode de Huppert Salkowski pour la recherche des matières colorantes biliaires dans les urines. *Nederl. Tijdschr voor Geneesk*, 20 nov. 1909.

Stokvis. — Das Gmelin'sche oxydations der Gaëlenfarbstoff, 1872.

— Ueber einstimmung der Urobilin met einens Gallen farbstoffe production. *Centr. fur. d. med. Wissensch.*, 1873.

Studenski. — Sur frage der quantitativ. Bestimmung der Urobilin in Harn. *St-Petersburger Wochenschr.*, n° 30, 1893.

Supino. — Sula ricerca di alcuni pigmenti biliari nelle feu et del loro significate clinico. *Gaz. d'Osped Milano*, 1903, p. 203.

Sweeney. — What. we learn from analyses of the fèces. *Lancet Clin.*, 1908, p. 646-652.

Lad Syllaba. — Zur Diagnose der schwœcheren Grade des Ikterus. *Folia hœmatologica*, 1904.

Tarruella. — Sobre la urobilinuria. Barcelona, 1899.

Terrien. — Thèse de Paris, 1899.

Thudichum. — The progress of medical chemistry comprising its application to physiology. *Pathology and Practice of Medecine.* London, 1896.

— Uroerythrine. *Journ. of. the chemic society*, t. XIII, p. 399, 1875.

— On the reaction of some biliary principtes, particulary bilirubine with iodine in *Med. Press.* et *Circ.* London 1896, p. 203.

— The Hasting. Prize. *Essai* 1853.

— Urochrome the colouring matter of urine. *Brit. m. j.* 1864.

Chemische untersuchung über du Gallen pigment in *J. of. Pract. Chem.*, 1868, p. 169 et 257.

— Further researches on bilirubin and its compounds. *Journ, of the society*, 1875.

Tissier. — Thèse de Paris, 1889, *Gaz. hôp.*, 1891, 11 juillet.

Triboulet. — Contrôle des fonctions biliaire et intestinale chez l'enfant par la réaction du sublimé acétique sur les selles. *Bull. et Mém. Soc. méd. hôp.*, 1909, p. 445.

— Sur un procédé pratique d'appréciation de la fonction biliaire par l'examen des selles chez les nourrissons. *Soc. de biol.* 12 mars 1909

— Des selles bileuses des nourrissons. *Soc. de Pédiatrie*, 16 mars 1909.

Triboulet. — Méthode pour l'examen rapide des fonctions biliaire et intestinale chez les enfants à l'état normal et à l'état pathologique. *La Clinique*, 12 mars 1909.

Triboulet, Ribadeau, Dumas, Harvier. — Sur l'examen chimique systématique des selles dans la pathologie du premier âge. *Soc. de Pédiatrie*, 16 fév. 1909

Troisier. — Urobilinhémie d'origine hémolytique. *Soc. de biol.* mai 1909, p. 739.

Tugendreich. — Mittheilung uber. Urobilinurie in Kindes halter, *Arch. f. Kind.* Vol. 38, fasc. 34.

Ullman. — The clinical importance of the examination of feces. *Buffalo med. Journ*, 1896-1897, pp. 89-98.

Ury. — Zur methodik der fäkalantersanchegen. *Deutsche med. Woch.*, 1901, p. 718-723.

— Ueber einiges praktisch Wichtige aus der fakaluntersuchung. *Berlin. Klin. Thera* Wochen, 1905, p. 1155-1159.

Vanaini. — Urobilinurie. *Broch. Bologne*, 1897.

Van Lair et Masius. — Stercobiline. *Centralbl. Mediz-Wissensch*, 1871, n° 24.

Van Leersum. — Urobiline. *Tijdest von Geneest*, 8 juin, 1899.

Vaughan Harley. — *British Med. Journ.*, 1896.

Vierordt. — Analyse spectrophotométrique de l'urine. Die anwendung der spectral Appreates, etc., Tubingen, 1873. Die quantitative spectral analyse und ihn Andwendung auf physiologie, etc. Tubingen, 1876.

— Stercorine. *Jahrb. f. Thier. Chemie*, 1875, p. 132.

Viglezio. — Sulla patogenèse dell' Urobilinurie. Lo sperimentale,

anno XLV, 15 sept. 1991. *Memori originali. Fascicul. III et IV*, pp. 225-271.

Vitali. — Pathogénie et séméiotique de l'urobilinurie. *Il Morgagni avril.*, 1897.

Vitali et Hammarsten. — Contribution à l'étude de la bile humaine. *Jahrb. Thier Chemic*, VIII. p. 263.

Vossius. — *Arch. f. Esperiment. Pathol. und Pharmak*, 1879, XI, p. 427.

Wats. — *Dictionnary of chimie*, t. II, p. 1.

Weil-Hallé. — Thèse Paris, 1904.

— *Revue mensuelle des maladies de l'enfance*, 1904.

Wernicke. — Coprologia. *An. de chir. med. art.* 1891, p. 585-602,

— Lehrbuch der physiologischen chemie. Jena 1897, p. 585.

Wertheimer et **Lepage.** — Sur les voies d'absorption du pigment biliaire du foie. *Arch. de Phys.* 1897, p. 363.

Wile. — The examination of fœces. *N. York. Med Jf.* 1905, p. 475-478.

Wilm et **Hanriot.** — *Chimie biologique* III, Paris 1889.

Winter. — Recherches de l'urobiline dans la bile. *Soc. de biol.*, 1889.

Wurtz. — Dictionnaire de chimie pure et appliquée, article urine, t. III, p. 486, 1878.

Yvon. —*Manuel chimique de l'analyse des urines*, 4e édition, p. 261,

Zahorsky. — Examinations of the stools of infants. *Pediatrico N. Y.*, 1908, pp. 760, 763.

Zoja. — Sul significato clinica delle feri grosse. *Clinica Medica. italiano*, Milano, 1898, pp. 588-590.

— Ueber Uroerythrine und Hematoporphyrine im Harm. *Centralbl. f. d.e med Wiessensch.*, 1892, n° 39, p. 105.

— *Archivio ital. clin. med.*, 1893.

VU :
Le Doyen,
LANDOUZY

VU :
Le Président de la thèse,
GILBERT.

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS..... 7

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS.

CHAPITRE PREMIER. — **Considérations générales sur l'hydrobilirubine, l'urobiline, la stercobiline et leurs chromogènes**..... 8
CHAPITRE II. — **Histoire et critique des principaux procédés de dosage de l'urobiline et de la stercobiline**... 23

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — **La Fluorescence, fondement de notre méthode de dosage**..... 31
1. La Fluorescence en général..... 31
2. La Fluorescence révélée par un réactif spécial..... 36
3. La Fluorescence observée à la lumière artificielle..... 38
CHAPITRE II. — **L'appareil proprement dit de dosage ou hydrobilirubinomètre**..... 41
CHAPITRE III. — **Les préliminaires du dosage**..... 47
1. Principe général..... 47
2. Solution-étalon d'hydrobilirubine..... 48
3. Fluorescence-limite..... 51
CHAPITRE IV. — **Manuel opératoire**..... 54
1. Détermination à l'aide de la solution étalonde la fluorescence-limite..... 54
2. Dosage proprement dit..... 58
a). Procédé d'extraction des urines et des fécés de l'urobiline et de la stercobiline..... 59
b). Détermination de la teneur en urobiline ou stercobiline des urines ou des fécés examinées..... 67
c). Calculs..... 70
CONCLUSIONS..... 74
BIBLIOGRAPHIE..... 77

Le Mans. — Imprimerie Monnoyer. — 1910.